

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ETOLOGIA ED ECOLOGIA ANIMALE  
(XXIII CICLO)**

**Gli Anfipodi sopralitorali come bioindicatori  
di contaminanti organici e metalli in traccia  
di coste sabbiose e rocciose**

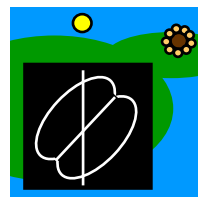
Tesi di

**Silvia Somigli**



**Coordinatore Prof. Alberto Ugolini  
Tutor Prof. Alberto Ugolini**

**(2010)**





**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA “L. Pardi”**

**DOTTORATO DI RICERCA IN ETOLOGIA ED  
ECOLOGIA ANIMALE  
(XXIII CICLO, BIO 05, BIO 07)**

**Gli Anfipodi sopralitorali come bioindicatori  
di contaminanti organici e metalli in traccia  
di coste sabbiose e rocciose**

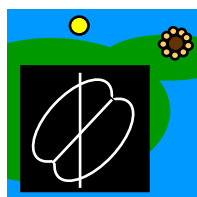
**Tesi di**

**Silvia Somigli**

**Coordinatore Prof. Alberto Ugolini**

**Tutor Prof. Alberto Ugolini**

**(2010)**





## INDICE

### CAPITOLO

1. Introduzione	pag. 5
2. Trace metals accumulation in the Mediterranean beachflea <i>Orchestia montagui</i> (Audouin) (Crustacea, Amphipoda) in the Tuscan Archipelago National Park	27
3. Variazione stagionale nell'accumulo di metalli in traccia in <i>Orchestia montagui</i> (Audouin) (Crustacea, Amphipoda)	41
4. <i>Posidonia oceanica</i> (L.) Delile come bioindicatore della contaminazione litorale: confronto tra piante vive e spiaggiate	57
5. Relationship between heavy metals pollution and genetic diversity in Mediterranean populations of the sandhopper <i>Talitrus saltator</i> (Montagu) (Crustacea, Amphipoda)	79
6. The amphipod <i>Talitrus saltator</i> as a bioindicator of human trampling on sandy beaches	101
7. Sandhoppers, beachfleas and Mediterranean beach contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)	121
8. Bioaccumulo di metalli in traccia e idrocarburi policiclici aromatici in tre specie di anfipodi sopralitorali	139
9. Conclusioni generali	149



## RIASSUNTO

Il sopralitorale di coste sabbiose e rocciose è caratterizzato da un notevole apporto di inquinanti di varia natura, di origine sia marina che terrestre. Tra le sostanze che costituiscono una seria minaccia per gli ecosistemi naturali vi sono i metalli in traccia e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) a causa della loro tossicità, persistenza, difficile biodegradabilità e la tendenza ad essere accumulati negli organismi.

Tra i numerosi organismi proposti come bioindicatori della contaminazione ambientale, studi condotti su anfipodi talitridi hanno mostrato che questi crostacei sono buoni bioindicatori della contaminazione da numerosi metalli in traccia, inoltre studi recenti su alcuni anfipodi europei hanno messo in evidenza come questi siano altamente sensibili ad alcuni IPA e pertanto buoni candidati per la stima della contaminazione da idrocarburi.

Pertanto, gli scopi della mia tesi sono quelli di valutare la capacità di bioaccumulo di metalli in traccia in *Orchestia montagui* e di IPA in *Talitrus saltator* e *O. montagui* per determinare il possibile utilizzo di questi anfipodi come bioindicatori della contaminazione del sopralitorale. E' stata, inoltre, valutata anche la possibilità di utilizzare *T. saltator* come bioindicatore degli effetti diretti della frequentazione turistica dei litorali sabbiosi. Infine, vista la relazione ecologica tra le banquettes di *Posidonia oceanica* e *O. montagui*, la cui presenza è strettamente associata alla presenza di foglie spiaggiate di questa fanerogama, è stato indagato lo stato di contaminazione delle banquettes in relazione a quello delle praterie di *Posidonia*.

I risultati ottenuti hanno validato l'utilizzo di *T. saltator* e *O. montagui* come bioindicatori della contaminazione ambientale da metalli in traccia e da IPA. *T. saltator* è risultato essere particolarmente sensibile agli effetti dell'human trampling, inoltre l'impiego della variabilità genetica quale biomarker da esposizione ne ha evidenziato l'applicabilità in questa specie di anfipode.

*P. oceanica* si è confermata come ottimo bioindicatore della contaminazione da metalli in traccia nelle aree costiere, inoltre la minor o maggior concentrazione di tali inquinanti nelle banquettes rispetto a quella registrata nelle foglie della pianta viva non sembra influire in modo significativo sulla capacità di accumulo di *O. montagui*.

In conclusione, *O. montagui* e *T. saltator* si configurano come validi bioindicatori della contaminazione ambientale di litorali sabbiosi e rocciosi e *T. saltator* potrebbe inoltre essere utilizzato per valutare gli effetti della frequentazione turistica del sopralitorale nell'ottica di una migliore gestione e tutela delle zone costiere.





# **CAPITOLO 1**

## **Introduzione**

---



## 1. ECOLOGIA ED IMPATTO ANTROPICO NELLE AREE COSTIERE

La popolazione umana, che nel 1999 raggiungeva i 6 miliardi di persone, è prevista aumentare del 50% in meno di 50 anni (US Census Bureau 2009). Il rapido aumento demografico ha portato ad una accelerata distruzione degli habitat naturali e all'aumentato sfruttamento delle risorse naturali causando enormi danni agli ecosistemi di tutto il mondo. Gran parte degli impatti di origine antropica sono concentrati lungo le linee di costa, amplificati dallo spostamento della popolazione verso le zone costiere (Defeo et al., 2009). Le aree costiere, le quali occupano meno del 15% della superficie terrestre, ospitano infatti più del 60 % della popolazione mondiale (EEA, 1999) e si prevede che oltre il 75% delle persone vivranno nel raggio di 100 km dalla costa entro il 2025, un fenomeno a scala mondiale (EEA, 2006a).

L'intensificarsi delle attività antropiche in Paesi che si affacciano su bacini chiusi o semi-chiusi come il Mar Mediterraneo, a lungo termine agiscono producendo un forte impatto a livello ambientale, rappresentando fonti di degrado per gli ecosistemi marini e costieri.

Nel nostro paese, come nelle altre aree del Mediterraneo, per molti secoli la colonizzazione delle aree costiere era rimasta limitata soprattutto alle foci dei principali fiumi ed entro baie protette. Dall'inizio del secolo scorso, questi ecosistemi sono invece stati esposti a molteplici, e spesso combinati, fattori di disturbo e di pressione antropica. La realizzazione di grandi infrastrutture (strade e ferrovie) in prossimità delle zone costiere, infatti, ha dato il via al processo di urbanizzazione delle coste e del loro sfruttamento turistico, agricolo, industriale, commerciale ed estrattivo (ISPRA, 2009; Quaderni Habitat, 2002). La trasformazione del paesaggio costiero in risposta alla crescente urbanizzazione, tuttavia, non ha coinvolto solamente le zone situate sulla terraferma, in quanto anche la zona intertidale e le acque costiere situate in prossimità di estuari hanno subito una alterazione sempre più crescente in termini di perdita e frammentazione di habitats e di proliferazione di una gran varietà di strutture costruite dall'uomo come frangiflutti, dighe marittime e banchine (Bulleri e Chapman, 2010).

Tra i principali fattori di degrado ambientale nelle aree costiere i problemi che destano maggior preoccupazione sono (EEA, 2006b; Schlacher et al, 2007; Defeo et al., 2009):

- *Acque di scarico, deflussi urbani ed effluenti industriali* molto spesso immettono nell'ambiente composti di origine antropogenica determinando un aumento della sua contaminazione
- *Rifiuti solidi.*
- *L'urbanizzazione* delle aree costiere, con lo sviluppo sfrenato di infrastrutture turistiche, aree portuali, strade, cave di sabbia e roccia spesso comporta perdita di biodiversità, distruzione e

alterazione di habitat, modificando irrimediabilmente il litorale naturale.

- *Eutrofizzazione* dei corpi d'acqua in prossimità di porti e baie semichiusa a causa di effluenti urbani che molte volte contengono considerevoli quantità di nutrienti e materia in sospensione.
- *L'erosione costiera*, in gran parte provocata da cause naturali, può essere notevolmente amplificata dalle attività di origine antropica portando a cambiamenti nella morfologia delle coste.
- *Trasporto marittimo*. Una delle fonti principali di inquinamento da idrocarburi del Mar Mediterraneo a causa di operazioni come lo scarico delle acque di zavorra, il lavaggio delle cisterne, gli scarichi di combustibile e petrolio o sversamenti dovuti ad incidenti di navigazione e nei depositi petroliferi.

Oltre alle minacce legate alla navigazione e alle attività a terra, numerosi altri problemi vengono ritenuti preoccupanti per la salute degli ecosistemi marini e costieri come ad esempio i cambiamenti climatici, il degrado della catena alimentare causato dalla pesca, le intense attività di acquacoltura, l'invasione di specie aliene e l'inquinamento luminoso.

Le spiagge che dominano la gran parte delle zone costiere di tutto il mondo sono tenute in gran considerazione da parte della società a causa del loro alto interesse economico, tuttavia solo recentemente l'attenzione si è spostata sull'intrinseco valore ecologico di questi ecosistemi (Brown e McLachlan, 2006; Schlacher et al, 2007). L'evoluzione degli habitat costieri dipende sia dai cambiamenti che avvengono sulla terraferma che dalla dinamica dell'ambiente marino. Le molteplici facies presenti sui litorali, costituiti da banquettes, vegetazione psammofila e alofita, scogliere a picco e coste rocciose, spiagge sabbiose e zone di marea, ma anche estuari e lagune, rappresentano numerosi ambienti dove vivono organismi come crostacei e insetti e forniscono inoltre siti di nidificazione e di foraggiamento a numerose specie di uccelli e rettili (Schlacher et al, 2007; Defeo et al., 2009).

Le spiagge sabbiose, ma in parte anche quelle di natura rocciosa, forniscono servizi unici a livello ecologico, molti dei quali sono essenziali per l'utilizzo e lo sfruttamento delle coste da parte dell'uomo. Tra i più importanti si possono includere: filtrazione di ampi volumi di acqua, trasporto e deposito dei sedimenti, riciclo e mineralizzazione di nutrienti, dissipazione dell'energia del moto ondoso e funzione cuscinetto contro eventi quali tempeste e maremoti, stoccaggio di materiale organico e contaminanti (Schlacher et al, 2007; Defeo et al., 2009).

I litorali sabbiosi e rocciosi, pur apparendo habitat quasi privi di vita, sono caratterizzati da un'elevata biodiversità in quanto ospitano popolazioni di invertebrati, diatomee, batteri ed alghe che presentano una serie di adattamenti

morfologici ed ecofisiologici necessari per vivere in questi ambienti estremamente dinamici (Bergerard, 1989; Brown e McLachlan, 2006). La macrofauna di invertebrati che domina questi ambienti in termini di abbondanza e di biomassa è rappresentata principalmente da crostacei, molluschi e anellidi, i quali includono predatori, detritivori, filtratori, spazzini e grattatori. (Defeo et al., 2009). I litorali che ricevono significativi apporti di materiale spiaggiato (alghe e piante marine) forniscono inoltre un ulteriore habitat, costituito dagli ammassi di questi vegetali, a diverse comunità sopralitorali di crostacei ed insetti.

La fascia del sopralitorale è un ambiente ecotonale di notevole importanza ecologica, facendo parte di un'area di transizione tra due diversi ecosistemi, quello marino e quello terrestre, e come tale è caratterizzata dalla presenza di fattori abiotici di stress di notevole intensità (temperatura, umidità, salinità). Le caratteristiche di questi ambienti rendono difficile la sopravvivenza degli organismi che vi abitano ed è per questo motivo che molte specie tipiche del sopralitorale presentano molteplici e peculiari adattamenti morfologici, ecofisiologici e comportamentali (Pardi e Ercolini, 1986; Chelazzi e Vannini, 1988; Brown e McLachlan, 2006).

## **1.1. INQUINAMENTO COSTIERO**

Le aree costiere, zone di transizione tra ambiente marino e terrestre, sono soggette a numerose fonti di contaminazione. L'inquinamento generato da attività che si sviluppano sulla terraferma possono raggiungere le coste attraverso corsi d'acqua i quali possono accumulare significativi carichi di inquinanti quali pesticidi, nutrienti, metalli pesanti, contaminanti e organici e sostanze chimiche industriali. La grande varietà di inquinanti presenti in questi ambienti possono creare notevoli danni agli organismi che vi risiedono, fino a diventare un serio pericolo a livello ecosistemico.

Nel corso degli ultimi anni l'inquinamento ambientale ha ricevuto sempre più attenzione proprio a causa dell'effettiva pericolosità per la salute umana e gli effetti dannosi esercitati sui sistemi biologici. In particolare, importanti effetti sanitari, che possono comportare patologie acute e croniche, sono attribuibili a componenti xenobiotici come, ad esempio, gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e i metalli pesanti.

### **1.1.1. *Metalli in traccia***

Tutti i metalli, componenti naturali della crosta terrestre, sono soggetti a cicli biogeochimici che comportano la mobilizzazione e la deposizione tra rocce e suoli, fiumi e ruscelli, estuari e oceani e all'interno dell'atmosfera. I flussi tra i serbatoi naturali di metalli caratterizzano i cicli di questi elementi e l'influenza primaria dell'attività umana è l'accelerazione di questi flussi che a livello

globale comporta una modificazione di ciò che avviene naturalmente, e a livello locale causa un elevato accumulo della concentrazione di metalli che può portare alla compromissione del delicato equilibrio degli ecosistemi naturali (Luoma e Rainbow, 2008).

La presenza dei metalli in traccia negli ecosistemi naturali rappresenta una seria minaccia a causa della loro elevata tossicità, persistenza, difficile biodegradabilità e tendenza ad accumularsi negli organismi (Ikem e Egiebor, 2005).

Il largo utilizzo dei metalli da parte dell'uomo nelle attività di tipo industriale e commerciale ha generato un incremento della messa in circolazione di questi elementi nei vari compartimenti ambientali (atmosfera, suolo e acqua). Attualmente è l'attività antropica ad avere il maggior impatto, a livello globale e regionale, sui cicli della maggior parte degli elementi in traccia determinando una significativa contaminazione ambientale ed un accumulo accelerato di metalli tossici nella catena alimentare umana (Nriagu e Pacyna, 1988; Nriagu, 1990).

Alcuni metalli in traccia (come ad esempio Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As) sono necessari, in dosi molto ridotte, per numerosi organismi viventi giocando un ruolo essenziale in vari processi metabolici. Un' elevata introduzione di questi metalli può tuttavia generare un effetto dannoso, in quanto tutti i metalli in traccia, essenziali e non, sono potenzialmente tossici superata una determinata soglia di disponibilità.

#### **1.1.2. Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)**

Gli idrocarburi policiclici aromatici sono idrocarburi costituiti da due o più anelli aromatici, quali quello del benzene, uniti fra loro in un'unica struttura.

Questi contaminanti organici sono generalmente caratterizzati da un'alta persistenza, elevata tossicità e difficile degradabilità in quanto scarsamente idrosolubili e dotati di un'elevata capacità di aderire al materiale organico. Inoltre, essendo composti altamente lipofili, tendono ad accumularsi negli organismi. Date le loro caratteristiche, gli IPA sono stati ampiamente studiati nei vari compartimenti ambientali, anche a causa delle loro proprietà cancerogene e mutagene (Lehr e Jerina, 1977; McElroy et al., 1989).

Le fonti degli IPA sono sia antropiche che naturali, tuttavia la maggior parte degli IPA presenti nell'ambiente sono di origine antropica. Le sorgenti naturali sono rappresentate dalla biosintesi effettuata dalle piante e dai batteri, dagli incendi boschivi e dalle emissioni gassose sprigionate durante le eruzioni vulcaniche. La formazione di IPA per cause antropiche è dovuta principalmente al traffico veicolare, alle attività industriali legate alla combustione di combustibili fossili, agli impianti di riscaldamento e di produzione di energia, all'incenerimento dei rifiuti, all'impiego di asfalti, agli sversamenti in mare (Soclo et. al, 2000; Rost et al., 2002; Boonyatumanond et al., 2006).

Il traffico petrolifero nel Mediterraneo, inoltre, è il più elevato tra i trasporti di merci, rappresentando circa il 20% del traffico mondiale marittimo.

Nel bacino del Mediterraneo sono infatti presenti 82 porti petroliferi ed altrettante raffinerie, ed è proprio l'Italia la nazione con il più alto numero di raffinerie (14 porti petroliferi, 17 raffinerie) che lavorano più di un quarto del greggio rispetto a tutto il Mediterraneo.

L'elevato traffico di idrocarburi in Mediterraneo costituisce probabilmente il più grave pericolo per la sopravvivenza di questo mare, il quale presenta la più alta densità di idrocarburi a livello mondiale. L'inquinamento da idrocarburi collegato alle attività in mare ha principalmente due distinte origini:

- contaminazione derivata dall'attività operativa delle navi (come lo scarico in mare di acque di zavorra e il lavaggio delle cisterne)
- inquinamento dovuto ad incidenti (possono avere conseguenze devastanti sia sugli ecosistemi marini che sulle economie locali legate al mare)

Nell'inverno del 2002, in seguito ad un incidente della petroliera "Prestige", 64.000 tonnellate di petrolio si sono riversate in mare a largo delle coste della Galizia (Spagna) causando la morte del 10% degli uccelli costieri (*Phalacrocorax aristotelica*, marangone dal ciuffo) e riducendo del 50% il loro successo riproduttivo rispetto alle colonie che non erano state raggiunte dallo sversamento di petrolio (Veland et al., 2005).

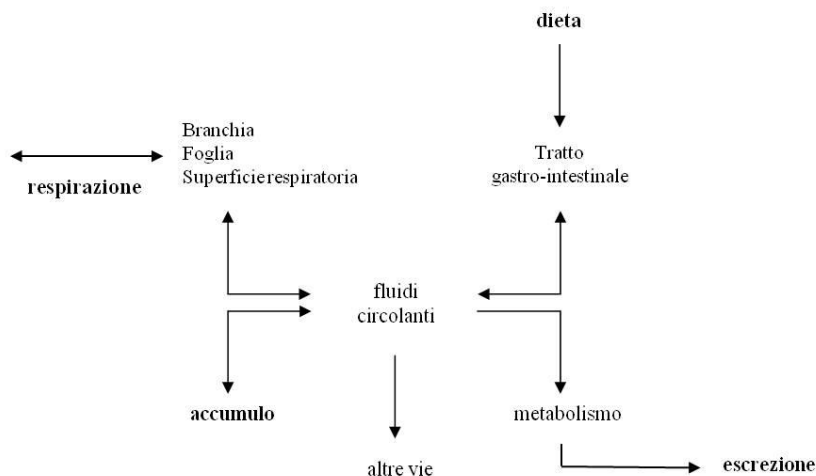
Inoltre, sei mesi dopo l'incidente le popolazioni di invertebrati delle spiagge esposte, in particolar modo crostacei isopodi (*Eurydice*) e anfipodi, il polichete *Scolecopsis squamata*, varie specie di nemertini e ditteri, avevano subito una significativa riduzione e la loro abbondanza è risultata inversamente correlata al gradiente di contaminazione (De La Huz et al., 2005; Junoy et al., 2005).

## 1.2. BIOACCUMULO

Con il termine "bioaccumulo" si indica il "processo attraverso il quale un composto chimico viene assunto da un organismo o per via diretta tramite l'esposizione al medium contaminato o attraverso l'ingestione di cibo contenente tale composto" (definizione dell'U.S. Environmental Protection Agency, 2010) (Fig.1).

Il bioaccumulo è da considerarsi una buona misura integrativa dell'esposizione degli organismi ad un inquinante all'interno di un ambiente contaminato e dipende, in qualsiasi tipo di habitat, dall'equilibrio tra due processi: assimilazione ed escrezione. La concentrazione di un determinato composto chimico all'interno di un organismo risulta, quindi, dalla differenza netta tra assimilazione ed escrezione integrate nel tempo.

La biodisponibilità di dato elemento descrive, invece, la misura relativa di quella frazione ambientale che un organismo può assumere quando viene a contatto con molteplici fonti di esposizione come aria, acqua e cibo (Rand et al., 1995). Il bioaccumulo di un composto inquinante risulta pertanto influenzato da



**Fig. 1.** Schema generale per i fenomeni di bioaccumulo (da Vighi e Bacci, 1998)

numerosi fattori geochimici e biologici: cambiamenti nel pH o nella salinità dell'acqua, differenze climatiche e stagionali che influiscono sulla disponibilità ambientale di un elemento, granulometria di un sedimento e il suo contenuto di carbonio organico, differenze specie-specifiche a livello fisiologico e nel comportamento alimentare, variazioni intraspecifiche dipendenti dalle dimensioni dell'organismo (Rainbow e Moore, 1990; Weeks e Rainbow, 1993a; Baumard et al., 1998, 1999; Rainbow, 1995, 2006; Schlacher-Hoenlinger e Schlacher, 1998; Fialkowsky et al., 2003; Marsden et al., 2003; Rainbow et al., 2004; Lafabrie et al., 2007; Luoma e Rainbow, 2005; Soclo et al., 2008).

Come risultato della variabilità interspecifica nell'efficienza di assimilazione e nel tasso di escrezione, organismi che vivono in uno stesso ambiente possono mostrare concentrazioni corporee di un composto inquinante molto differenti anche tra taxa strettamente imparentati (Moore e Rainbow, 1987; Hare et al., 1991; Rainbow, 1998; Ugolini et al., 2005). Nel caso dei metalli in traccia, ad esempio, la concentrazione di Zn nei mitili o in decapodi caridei risulta molto alta rispetto a quella di altri molluschi bivalvi, ed anche tra crostacei esiste un'altissima variabilità perfino all'interno dello stesso ordine (Tab. 1) (Phillips e Rainbow, 1994; Rainbow, 1998, 2002, 2007; Ugolini et al., 2004).

Differenze nell'habitat, livello trofico e comportamento alimentare, sono altri fattori che hanno notevole influenza sul bioaccumulo di inquinanti. L'accumulo di contaminanti idrofobici quali gli IPA, è molto elevato per quegli organismi che vivono in stretto contatto col sedimento (infossati nel terreno o in



zone con acque molto torbide) rispetto a carnivori meno esposti a particelle sedimentarie (Lake et al. 1990; Hickey et al. 1995; Zoulaga et al., 2009). Baumard e collaboratori (1998) hanno inoltre rilevato che il bioaccumulo di questi composti organici è legato anche alle capacità di biotrasformazione di un organismo, infatti il mollusco *Mytilus galloprovincialis*, tende ad accumulare IPA a maggior peso molecolare rispetto a pesci come *Mullus barbatus* e *Serranus scriba* le cui capacità di biotrasformazione di questi contaminanti risultano maggiori.

Specie	Località	Zn (ng/g peso secco)
<b>CIRRIPIEDIA</b>		
<i>Tetraclita squamosa</i>	Hung Hom, Hong Kong (C)	6.963
	Tung Chung, Hong Kong (U)	2.245
<i>Balanus amphitrite</i>	Chai Wan Kok, Hong Kong (C)	9.353
	Lai Chi Chong, Hong Kong (U)	2.726
<i>Semibalanus balanoides</i>	Dulas Bay, Wales (C)	50.280
	Menai Strait, Wales (U)	19.230
<b>MALACOSTRACA</b>		
<b>AMPHIPODA</b>		
<i>Orchestia gammarellus</i>	Restronguet Creek, England (C)	392
	Millport, Scotland (U)	188
<i>Talorchestia quoyana</i>	St Kilda, Dunedin, New Zealand (C?)	481
	Sandfly Bay, Dunedin, New Zealand (U)	133
<i>Talitrus saltator</i>	Piombino, Italy (C)	242
	Albegna, Italy (U)	155
<b>DECAPODA</b>		
<i>Palaemon elegans</i>	Millport, Scotland (U)	81
<i>Pandalus montagui</i>	Firth of Clyde, Scotland (U)	58

**Tab. 1.** Concentrazione di Zn ( $\mu\text{g/g}$  peso secco) tra crostacei (cirripedi, anfipodi e decapodi) provenienti da località contaminate (C) e non contaminate (U) (da Ugolini et al., 2004; Rainbow, 2007 modificato).

### 1.3. BIOMONITORS

Numerosi programmi di monitoraggio delle aree costiere valutano lo stato di contaminazione di un ambiente attraverso la misura della concentrazione di inquinanti nell'acqua e nel sedimento. Queste misure, tuttavia, presentano numerosi svantaggi. I dati ottenuti analizzando la concentrazione di contaminanti in ambiente acquatico, oltre a sottostimare molto spesso la reale concentrazione a causa sia dei limiti di rilevabilità delle apparecchiature sia della natura dei contaminanti, riguardano la concentrazione totale e non la frazione biodisponibile di un composto, oltretutto forniscono indicazioni sulla presenza della quantità di un inquinante in un singolo momento senza tener conto delle possibili variazioni giornaliere o stagionali

(Lin et al., 1994). La determinazione dei contaminanti attraverso la misura nel sedimento, anche se facilmente quantificabile dagli strumenti di analisi, può fornire risultati viziati dall'influenza che alcuni parametri fisico-chimici (contenuto di carbonio organico, granulometria del sedimento) hanno sulla concentrazione del composto inquinante e richiedono inoltre analisi molto lunghe e costose (Rainbow, 2006).

L'approccio della tossicologia classica, pertanto, risulta spesso insufficiente a fornire adeguati strumenti di controllo e protezione dell'integrità di ecosistemi complessi. Per questo motivo l'attenzione si è spostata sull'utilizzo di organismi (biomonitors) in grado di accumulare quantità misurabili di elementi chimici e/o xenobiotici nei loro tessuti fornendo una misura relativa della quantità totale di questi composti assunta da tutte le vie di assimilazione in un determinato intervallo temporale.

Una specie, animale o vegetale, per poter essere utilizzata come biomonitor, oltre alla capacità di accumulare contaminanti persistenti (naturali o di sintesi) o a mostrare verso di essi specifiche reazioni, deve possedere dei requisiti ben precisi (Phillips e Rainbow, 1994; Vighi e Bacci, 1998):

- sedentarietà
- abbondanza, reperibilità e facile identificazione sistematica
- adeguate conoscenze sulla biologia ed ecologia della specie
- lungo ciclo vitale (in modo da poter rilevare la presenza degli inquinanti per un determinato periodo di tempo)
- possedere una quantità di tessuto sufficiente (essere abbastanza grandi) per le analisi
- sensibilità, ma anche una certa resistenza agli inquinanti
- alta tolleranza ad elevate concentrazioni di contaminanti
- facilità di allevamento e stabulazione per permettere analisi e test in laboratorio

#### **1.4. ECOLOGIA DEGLI ANFIPODI TALITRIDI SOPRALITORALI**

Gli anfipodi talitridi sono crostacei di piccole dimensioni che abitano la zona umida del sopralitorale di coste sabbiose e rocciose. Oltre a rappresentare la maggior componente in termini di biomassa, gli Anfipodi sopralitorali svolgono un ruolo chiave dal punto di vista del flusso dell'energia che passa attraverso l'ecosistema nutrendosi di materiale organico spiaggiato, di origine sia marina che terrestre, e costituiscono una fonte di cibo per numerose specie di coleotteri, pesci, uccelli ed anche mammiferi (Fig.2) (Palluault, 1954; Griffith et al., 1983; Wildish, 1988; Bergerard, 1989).



estesa.

I fattori orientanti principali sono costituiti dal campo gravitazionale e magnetico terrestre, la luna ed il sole (si veda Pardi e Ercolini, 1986 per una revisione). Oltre ai fattori orientanti appena citati, gli anfipodi talitridi si servono anche di fattori locali quali l'azione delle onde, la pendenza del substrato, l'umidità della sabbia e le caratteristiche del paesaggio (Williamson, 1951, 1954; Ercolini e Scapini, 1974; Craig, 1973b; Ugolini et al., 1986, 2006).

Nel campo dell'ecotossicologia, numerosi studi su litorali sommersi e intertidali di coste rocciose e sabbiose hanno concentrato la loro attenzione sull'utilizzo di un ampio ventaglio di organismi come bioindicatori della contaminazione ambientale (si veda ad esempio Rainbow e Phillips, 1993; Meador et al., 1995; Baumard et al., 1998; Lafabrie et al., 2007).

Tra i numerosi organismi proposti come biomonitor per l'inquinamento ambientale, studi condotti su anfipodi talitridi delle coste del Mar Baltico, del Mediterraneo e dell'Oceano Pacifico, hanno mostrato che questi crostacei sono buoni bioindicatori della contaminazione da numerosi metalli in traccia (per una revisione si veda Marsden e Rainbow, 2004; Ugolini et al., 2004, 2005, 2008), mentre studi recenti condotti su alcuni anfipodi europei hanno messo in evidenza come questi siano altamente sensibili ad alcuni IPA e pertanto buoni candidati per la stima della contaminazione da idrocarburi (Sanz-Lázaro et al. 2008).

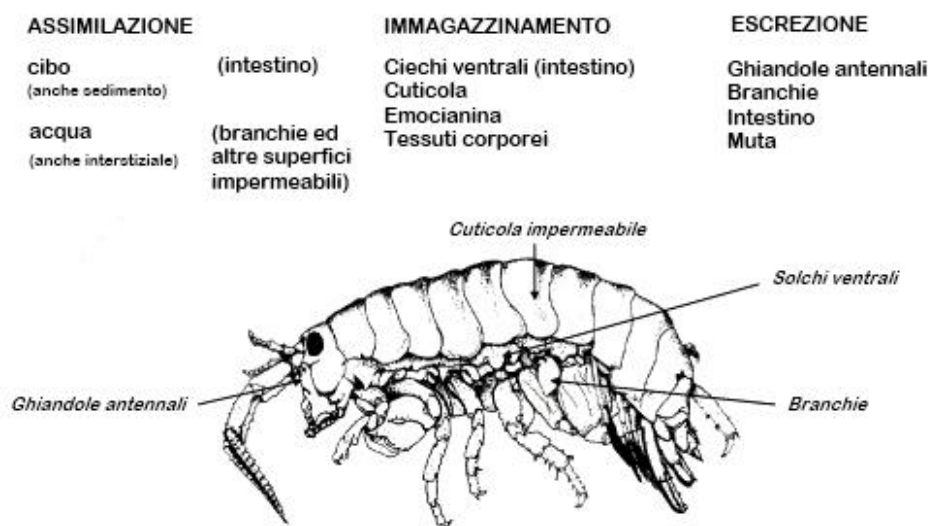


Fig.3. Schema delle potenziali vie di assimilazione, immagazzinamento ed escrezione dei metalli in traccia in un generico anfipode talitride (da Marsden e Rainbow, 2004, modificato).

L'accumulo di contaminanti in un organismo è il risultato dei processi di assimilazione, escrezione e detossificazione. L'assimilazione degli inquinanti dipende, oltre che dalle caratteristiche dei vari organismi, dalla concentrazione di questi nell'ambiente e dalle caratteristiche dell'ambiente stesso, come la salinità dell'acqua e le caratteristiche del sedimento (Marsden e Rainbow, 2004).

Negli anfipodi le principali vie di assimilazione dei contaminanti, come ad esempio i metalli in traccia, risultano essere il cibo e il medium acquoso (Weeks e Rainbow, 1991, 1993b). L'ecologia dei talitridi e il loro stretto contatto col substrato, lasciano presupporre che anche la porzione di contaminanti presenti nel sedimento possa rappresentare una possibile fonte di assimilazione, tuttavia le ricerche a riguardo sono scarse ed è difficile stimare con precisione la relazione tra contaminante presente nel sedimento e bioaccumulo da parte dell'organismo (Marsden e Rainbow, 2004).

La taglia, il peso corporeo e l'età di un organismo, influenzano la bioconcentrazione degli inquinanti nei suoi tessuti. Numerosi studi hanno, infatti, dimostrato l'esistenza di una relazione tra la concentrazione dei metalli (y) e il peso secco (x) in molti crostacei, tra cui alcuni anfipodi, espressa dalla formula  $y=ax^b$  (dove a e b sono costanti) (Rainbow e Moore, 1986; Phillips e Rainbow, 1988; Ridout et al., 1989; Moore et al., 1991).

Un ulteriore parametro ambientale che influisce largamente sul bioaccumulo di composti inquinanti è la stagione. I cambiamenti stagionali riguardano la temperatura, la luce, la disponibilità di cibo, ma anche cambiamenti quali la differenza nel peso corporeo o dello stato fisiologico di un organismo.

Una differenza stagionale nella concentrazione di Cu è stata registrata in alcune specie di anfipodi talitridi europei (Rainbow e Moore, 1990; Fialkowski et al., 2003), con concentrazioni inferiori nel periodo autunnale. Molti crostacei malacostraci, tra i quali anche i talitri e le orchestie (Spicer et al., 1987), presentano l'emocianina come pigmento respiratorio presente nell'emolinfa. Il Cu svolge un ruolo essenziale nel funzionamento metabolico dell'emocianina e anfipodi come *Talitrus saltator* che nei mesi più freddi si ibernano o rimangono inattivi presentano durante questi periodi concentrazioni inferiori di tale elemento. Probabilmente la ridotta attività rappresenta per questi organismi una strategia per minimizzare le energie basata sulla riduzione dei costi metabolici legati alla sintesi dell'emocianina (Marsden e Rainbow, 2004).

Per quanto riguarda l'accumulo di idrocarburi aromatici e l'influenza che la stagionalità può avere a tal proposito non sono presenti dati in letteratura su anfipodi talitridi. Tuttavia, Baumard e collaboratori (1999) hanno registrato una differenza nell'accumulo di IPA in *Mytilus edulis*, dipendentemente dalla stagione, con una maggior concentrazione negli animali nel mese di marzo rispetto ad ottobre. Questo risultato probabilmente è dovuto ad una combinazione di fattori quali una variazione nei livelli di IPA presenti nella

colonna d'acqua, ma anche un cambiamento dello stato fisiologico dei bivalvi con possibili conseguenze sulla velocità di filtraggio.

Le differenze stagionali nella disponibilità di risorse trofiche possono, inoltre, generare cambiamenti nel peso corporeo di alcuni organismi, portando alla riduzione del contenuto lipidico degli animali nei periodi di scarsità di fonti alimentari (Balthis et al., 2002) e quindi ad una possibile riduzione dell'accumulo di sostanze organiche lipofile come gli IPA (Bruner et al., 1994).

Negli anfipodi talitridi l'escrezione dei metalli in traccia avviene attraverso le ghiandole antennali, le branchie, l'intestino e la muta (Fig.3), mentre per quanto riguarda i meccanismi di detossificazione le ricerche sono scarse o assenti. Solo per quanto riguarda *Orchestia gammarellus* è stato possibile evidenziare il ruolo svolto dalle cellule dei ciechi ventrali dell'intestino nella detossificazione di Cu, Cd e Zn quando presenti in eccesso all'interno dell'organismo (Weeks, 1992; Nassiri et al., 2000).

La fascia del sopralitorale, di coste sia sabbiose che rocciose, molto spesso è caratterizzata dalla presenza di depositi vegetali (alghe e piante) spiaggiati che vanno a costituire una delle principali fonti di nutrimento e di rifugio per la macro- e meiofauna che vive in questo ambiente, come le numerose specie di anfipodi, isopodi, coleotteri e nematodi (Craig, 1973a; Kensley, 1974; Koop e Field, 1980; Richards, 1984; Ugolini et al., 1995; Colombini et al., 2000; Dugan et al., 2003; Jedrzejczak, 2002).

La presenza di alcune specie di anfipodi talitridi sui litorali, come ad esempio *Orchestia montagui*, è spesso associata alla presenza di accumuli formati dalle foglie di piante marine, fra cui *Posidonia oceanica* (L.) Delile la quale dà origine a depositi caratteristici, spesso di notevoli dimensioni, denominati *banquettes* (Molinier e Picard, 1953; Boudouresque et al., 2006).

*P. oceanica*, insieme a *Cymodocea nodosa* (Ucria) Asch., *Zostera noltii* Hornem. e *Zostera marina* L., è una delle quattro specie di fanerogame marine del Mediterraneo. Le fanerogame come *P. oceanica* svolgono un ruolo essenziale nella struttura e nel funzionamento degli ecosistemi costieri in quanto esercitano una notevole azione nella protezione della linea di costa dall'erosione ed inoltre costituiscono un habitat per numerosi organismi (Klumpp et al., 1989).

I resti di *P. oceanica* che si depositano sulla battigia subiscono diverse modificazioni che li rendono utilizzabili dalle reti trofiche costiere. Questo detrito, una volta frammentato da processi fisici e dagli organismi detritivori e rimineralizzato ad opera dei batteri, rappresenta un'importante fonte di carbonio, particolato e disciolto, e di nutrienti. Molti pesci allo stadio giovanile traggono parte delle loro risorse trofiche da organismi quali anfipodi e isopodi che vivono e si alimentano nella zona del litorale interessata dalla presenza di *banquettes* (Boudouresque et al., 2006).

Come altre specie di fanerogame marine, *P. oceanica* è molto sensibile ai cambiamenti delle condizioni ambientali e la sua ampia distribuzione geografica, insieme alla longevità ed alla facile reperibilità durante tutto l'arco

dell'anno la rendono particolarmente adatta per studi di tipo ambientale. *P. oceanica* è, infatti, impiegata molto spesso come bioindicatore sia della trasparenza delle acque costiere sia per la sua capacità di accumulare una grande varietà di contaminanti come ad esempio DDT, PCB e metalli in traccia (Augier et al., 1977; Chabert et al., 1984; Schlacher-Hoenlinger e Schlacher, 1998; Pergent-Martini e Pergent, 2000; Campanella et al., 2001; Lafabrie et al., 2007) è stata ampiamente documentata.

#### 1.4. SCOPI DELLA TESI

L'obiettivo della mia ricerca è stato quello di valutare il possibile utilizzo di alcune specie di anfipodi sopralitorali come bioindicatori della contaminazione costiera. In particolare, i punti principali su cui ho concentrato l'attenzione nella mia tesi hanno preso in esame:

- la capacità di bioaccumulo di alcuni degli inquinanti maggiormente presenti nelle zone costiere, contribuendo notevolmente alla contaminazione di questi ambienti: i metalli in traccia e gli idrocarburi policiclici aromatici. Lo studio dell'accumulo di metalli in traccia da parte di *Orchestia montagui* (Audouin) e di IPA in *T. saltator* e *O. montagui* può fornire le prime evidenze per il possibile utilizzo di questi anfipodi come biomonitors della contaminazione del sopralitorale da parte di queste classi di contaminanti.
- il possibile effetto della stagione nella bioconcentrazione di metalli e IPA in alcune specie di anfipodi in relazione alla disponibilità ambientale di tali composti
- la possibile relazione tra il contenuto di metalli in traccia e IPA in foglie vive e foglie spiaggiate di *P. oceanica*, in quanto la presenza di alcuni anfipodi, tra cui *O. montagui* è strettamente associata a quella delle banquettes permanenti. Inoltre, in seconda analisi, il monitoraggio della contaminazione delle banquettes di *Posidonia* potrebbe offrire utili indicazioni sullo stato ambientale delle praterie e del contesto costiero.

## 1.5. BIBLIOGRAFIA

- Augier, H., Gilles, G. & Ramonda, G.** 1977. Utilisation de la phanérogame marine *Posidonia oceanica* Delile pour mesurer le degré de contamination mercurielle des eaux littorales méditerranéennes. *Compte Rendu Académie des Sciences Paris*, **285**, 1557–1560.
- Balthis, W.L., Hyland, J.L., Scott, G.I., Fulton, M.H., Bearden, D.W. & Greene, M.D.** 2002. Sediment quality of the Neuse River estuary, North Carolina: an integrated assessment of sediment contamination, toxicity, and condition of benthic fauna. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, **9**, 213-225.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T. & Belloq, J.**, 1998. Concentration of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 951-960.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H. & Hansen, P. D.** 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research*, **47(1)**, 17-47.
- Behbehani, M.I. & Crocker, R.A.** 1982. Ecology of beach wrack in northern New England with special reference to *Orchestia platensis*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **15(6)**, 611-620.
- Bergerard, J.** 1989. Ecologie des laisses de marée. *L'année Biologique*, **28 (1)**, 39-54.
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A. & Takada, H.** 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, **52**, 942-956.
- Boudouresque, C.F., Bernard, G., Bonhomme, P., Charbonnel, E., Diviacco, G., Meinesz, A., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Ruitton, S. & Tunesi, L.** 2006. *Préservation et conservation des herbiers à Posidonia oceanica*. Ramoge pub., Marseille (France).
- Brown, A.C. & McLachlan, A.** 2006. *Ecology of Sandy Shores*. Elsevier, Amsterdam.
- Bruner, K.A., Fisher, S.W. & Landrum, P.F.** 1994. The Role of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, in Contaminant Cycling: I. The Effect of Body Size and Lipid Content on the Bioconcentration of PCBs and PAHs. *Journal of Great Lakes Research*, **20 (4)**, 725-734.
- Bulleri, F. & Chapman, M.G.** 2010. The introduction of coastal infrastructure as a driver of change in marine environments. *Journal of Applied Ecology*, **47**, 26-35.
- Campanella, L., Conti, M.E., Cubadda, F. & Sucapane, C.** 2001. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. *Environmental Pollution*, **111**, 117-126.



- Chabert, D., Vicente, N. & Huang, W.** 1984. Pollution par les composés organochlorés dans les rades du Parc National marin de Port-Cros. II-Contrôle pluriannuel. *Travaux scientifiques Parc national de Port-Cros*, **10**, 51-67.
- Chelazzi, G. & Vannini, M.** 1988. *Behavioural adaptations to intertidal life*. ASI series Vol. **151**, Plenum Press, New York.
- Colombini, I., Aloia, A., Fallaci, M., Pezzoli, G. & Chelazzi, L.** 2000. Temporal and spatial use of stranded wrack by the macrofauna of a tropical sandy beach. *Marine Biology*, **136**, 531-541.
- Craig, P.C.** 1973a. Behaviour and distribution of the sand-beach amphipod *Orchestoidea corniculata*. *Marine Biology*, **23**, 101-109.
- Craig, P.C.** 1973b. Orientation of the sand-beach amphipod, *Orchestoidea corniculata*. *Animal Behaviour*, **21**, 699-706.
- Defeo, O., McLachlan, A., Schoeman, D.S., Schlacher, T.A., Dugan, J., Jones, A., Lastra, M. & Scapini, F.** 2009. Threats to sandy beach ecosystems: A review. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **81**, 1-12.
- De La Huz, R., Lastra, M., Junoy, J., Castellanos, C. & Vieitez, J. M.** 2005. Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: preliminary study of the "Prestige" oil spill. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **65**, 19-29.
- Dugan, J.E., Hubbard, D.M., McCrary, M.D. & Pierson, M.O.** 2003. The response of macrofauna communities and shorebirds to macrophyte wrack subsidies on exposed sandy beaches of southern California. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **58S**, 25-40.
- EEA** 1999. Coastal and marine zones. In: *Environment in the European Union at the Turn of the Century*. Chapter 3.14. State of Environment Report N° 1/1999. EEA, Copenhagen.
- EEA** 2006a. The Changing Faces of Europe's Coastal Areas. EEA Report 6/2006. OPOCE, Luxembourg.
- EEA** 2006b. Priority Issues in the Mediterranean environment. Report N° 4/2006. EEA, Copenhagen.
- Ercolini, A. & Scapini, F.** 1974. Sun compass and shore slope in the orientation of littoral amphipods (*Talitrus saltator* Montagu). *Monitore Zoologico Italiano (N. S.)*, **8**, 85-115.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Zmudzinski, L.** 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 81-93.
- Geppetti L. & Tongiorgi P.** 1967. Nocturnal migrations of *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea, Amphipoda). *Monitore Zoologico Italiano (N. S.)*, **1**, 37-40.
- Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K.** 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches*

- as ecosystems (McLachlan, A. and Erasmus, T. Eds.), pp. 547-556, W. Junk, The Hague.
- Hare, L.A., Tessier, A. & Warren, L.** 1991. Trace elements distributions in aquatic insects: variations among genera, elements and lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **48**, 1481-1491.
- Hickey, C.W., Roper, D.S., Holland, P.T. & Trower, T.M.** 1995. Accumulation of organic contaminants in two sediment-dwelling shellfish with contrasting feeding modes: deposit (*Macoma liliana*) and filter-feeding (*Austravenus strutchburyi*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **29**, 221-231.
- Ikem, A. & Egiebor, N.O.** 2005. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 771-787.
- ISPRA** 2009. Il ripristino degli ecosistemi marino-costieri e la difesa delle coste sabbiose nelle Aree Protette. *Rapporti 100/2009*.
- Jedrzejczak, M.F.** 2002. Stranded *Zostera marina* L. vs wrack fauna community interactions on a Baltic sandy beach (Hel, Poland): a short-term pilot study. Part II. Driftline effects of succession changes and colonisation of beach fauna. *Oceanologia*, **44** (3), 367-387.
- Junoy, J., Castellanos, C., Vieitez, J. M., De La Huz, M. R. & Lastra, M.** 2005. The macroinfauna of the Galician sandy beaches (NW Spain) affected by the Prestige oil-spill. *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 526-536.
- Kensley, B.** 1974. Aspects of the biology and ecology of the genus *Tylos* Latreille. *Annals of South African Museum (South Africa)*, **65**, 401-471.
- Klumpp, D.W., Howard, R.K. & Pollard, D.A.** 1989. Trophodynamics and nutritional ecology of seagrass communities. In: *Biology of seagrasses* (Larkum, A.W.D., McComb, A.J. & Shepherd, S.A. Eds). pp. 394-457, Elsevier, Amsterdam.
- Koop, K. & Fields, F.J.** 1980. The influence of food availability on population dynamics of a supralittoral isopod, *Ligia dilatata* (Brandt). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **48**, 61-72.
- Lafabrie, C., Pergent, G., Kantin, R., Pergent-Martini, C. & Gonzalez, J.-L.** 2007. Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species – Validation of the use *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere*, **68**, 2033-2039.
- Lake, J.L., Rubinstein, N.I., Lee, H., Lake, C.A., Heltshe, J.H. & Pavignano, S.** 1990. Equilibrium partitioning and bioaccumulation of sediment-associated contaminants by infaunal organisms. *Environmental Contamination and Toxicology*, **9**, 1095-1106.
- Lehr, R.E. & Jerina, D.M.** 1977. Metabolic activation of polycyclic hydrocarbons. *Archives of Toxicology*, **39**, 1-6.
- Lin, E.L.C., Cormier, S.C. & Racine, R.N.** 1994. Synchronous flourometric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the

- bile of brown bullhead. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13** (5), 707–715.
- Luoma, S.N. & Rainbow, P.S.** 2005. Why is metal accumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology*, **39**, 1921-1931.
- Luoma, S.N. & Rainbow, P.S.** 2008. *Metal contamination in aquatic environments: science and later management*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Marsden, I.D., Rainbow, P.S. & Smith, B.D.** 2003. Trace metal concentration in two New Zealand talitrid amphipods: effects of gender and reproductive state and implication for biomonitoring. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **290**, 93-113.
- Marsden, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology-the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.
- McElroy, A.E., Farrington, J.W. & Teal, J.M.** 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment* (Varanasi, U., ed.). pp. 1–40, CRC press, Boca Raton (FL).
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L. & Varanasi, U.** 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **143**, 79-165.
- Molinier, R. & Picard, J.** 1953. Notes biologiques à propos d'un voyage d'études sur les côtes de Sicile. *Annales de l'Institut Océanographique*, **28**(4), 163-187.
- Moore, P.G. & Rainbow, P.S.** 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda. *Oecologia*, **73**, 120-126.
- Moore, P.G., Rainbow, P.S. & Hayes, E.** 1991. The beach-hopper *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor for copper and zinc: North Sea Trials. *Science of the total Environment*, **106**, 221-238.
- Nassiri, Y., Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Rainglet, F. & Smith, B.D.** 2000. Trace-metal detoxification in the ventral caeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology*, **136**, 477-484.
- Nriagu, J.O.** 1990. Global metal pollution: poisoning the biosphere? *Environment* **32** (7), 7–33.
- Nriagu, J.O. & Pacyna, J.M.** 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, **333**, 134-139.
- Palluault, M.** 1954. Notes ecologiques sur le *Talitrus saltator*. *Archives de Zoologie Experimentale et Générale*, **91**, 105-129.
- Pardi, L. & Ercolini, A.** 1986. Zonal recovery mechanisms in talitrid crustaceans. *Bollettino Zoologico*, **53**, 139-160.

- Pergent-Martini, C., & Pergent, G.** 2000. Marine phanerogams as a tool in the evaluation of marine trace-metal contamination: an example from the Mediterranean. *International Journal of Environment and Pollution*, **13**, 1-6.
- Phillips, D.J.H. & Rainbow, P.S.** 1988. Barnacles and mussels as biomonitors of trace elements: a comparative study. *Marine Ecology, Progress Series*, **49**, 83-93.
- Phillips, D.J.H. & Rainbow, P.S.** 1994. *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. 2nd edn., Chapman and Hall, London.
- Quaderni Habitat** (2002). Dune e spiagge sabbiose. Ambienti tra terra e mare. *Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Museo Friulano di Storia Naturale-Comune di Udine*. Vol. **4**.
- Rainbow, P.S.** 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, **31**, 183-192.
- Rainbow, P.S.** 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: *Metal Metabolism in Aquatic Environments* (W.J. Langston and M.J. Bebianno Ed.). pp. 285-319, Chapman and Hall: London.
- Rainbow, P.S.** 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, **120**, 497-507.
- Rainbow, P.S.** 2006. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, **12**, 107-122.
- Rainbow, P.S.** 2007. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environment International*, **33**, 576-582.
- Rainbow, P.S. & Moore, P.G.** 1986. Comparative metal analyses in amphipod crustaceans. *Hydrobiologia*, **141**, 273-289.
- Rainbow, P.S. & Moore, P.G.** 1990. Seasonal variation in copper and zinc concentrations in three talitrid amphipods (Crustacea). *Hydrobiologia*, **196**, 65-72.
- Rainbow, P.S. & Phillips, D.J.H.** 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **26**, 593-601.
- Rainbow, P.S., Fialkowski, W., Sokolowski, A., Smith, B.D. & Wolowicz, M.** 2004. Geographical and seasonal variation of trace metal bioavailabilities in the Gulf of Gdansk, Baltic Sea using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvisus*) as biomonitors. *Marine Biology*, **144**, 271-286.
- Rand, G.M., Wells, P.G. & McCarty, L.S.** 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (ed. by G.M. Rand), pp. 3-67, Taylor and Francis, Washington DC.
- Richards, L.G.** 1984. Field studies of foraging behaviour of and intertidal beetle. *Ecological Entomology*, **9**, 189-194.
- Ridout, P.S., Rainbow, P.S., Roe, H.S.J. & Jones, H.R.** 1989. Concentration of V, Cr, Mn, Fe, Ni, CO, Cu, Zn, As, Cd in mesopelagic crustaceans from the north east Atlantic Ocean. *Marine Biology*, **100**, 465-471.

- Rost, H., Loibner, A.P., Hasinger, M., Braun, R. & Szolar, O.H.J.** 2002. Behavior of PAHs during cold storage of historically contaminated soil samples. *Chemosphere*, **49**, 1239–1246.
- Rüppel G.** 1967. Tagesrhythmische und langfristige Faunenverschiebungen im marinen supralitoral. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, **60**, 338-375.
- Sanz-Lázaro, C., Marin, A. & Borredat, M.** 2008. Toxicity studies of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on European Amphipods. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **18**, 323-327.
- Schlacher-Hoenlinger, M.A. & Schlacher, T.A.** 1998. Accumulation, contamination, and seasonal variability of trace metals in the coastal zone – patterns in seagrass meadow from the Mediterranean. *Marine Biology*, **131**, 401-410.
- Schlacher, T.A., Dugan, J., Schoeman, D.S., Lastra, M., Jones, A., Scapini, F., McLachlan, A. & Defeo, O.** 2007. Sandy beaches at the brink. *Diversity and Distribution*, **13**, 556-560.
- Soclo, H.H., Garrigues, P. & Ewald, M.** 2000. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, **40**, 387-396.
- Soclo, H.H., Budzinski, H., Garrigues, P. & Matsuzawa, S.** 2008. Biota accumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Benin coastal waters. *Polycyclic Aromatic Compounds*, **28(2)**, 112-127.
- Spicer, J.I. & Janas, U.** 2006. The beachflea *Platorchestia platensis* (Krøyer, 1845): a new addition to the Polish fauna (with a key to Baltic talitrid amphipods). *Oceanologia*, **48 (2)**, 287-295.
- Spicer, J.I., Moore, P.G. & Taylor, A.C.** 1987. The physiological ecology of land invasion by the Talitridae (Crustacea: Amphipoda). *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **232**, 95-124.
- Ugolini, A., Scapini, F. & Pardi L.** 1986. Interaction between solar orientation and landscape visibility in *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology*, **90**, 449-460.
- Ugolini, A., Felicioni, S., Ruffo, S. & Cipriani, L.** 1995. Distribution of *Talorchestia ugoi* and other sandhoppers in Corsica. *Italian Journal of Zoology*, **62**, 291—296.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of the heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhoppers species: *Talitrus saltator* Montagu and *Talorchestia ugoi* Bellan Santini and Ruffo. *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.

- Ugolini, A., Somigli, S. & Mercatelli, L.** 2006. Green land and blue sea: a coloured landscape in the orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda, Talitridae). *The Journal of Experimental Biology*, **209**, 2509-2514.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaporti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349-357.
- U.S. Census Bureau International Data Base** 2009. World Population: 1950-2050. <http://www.census.gov/ipc/www/idb/worldpopgraph.php>
- Velando, A., Alvarez, D., Mourino, J., Arcos, F. & Barros, A.** 2005. Population trends and reproductive success of the european shag *Phalacrocorax aristotelis* on the Iberian peninsula following the Prestige oil spill. *Journal of Ornithology*, **146**, 116-120.
- Vighi, M. & Bacci, E.** 1998. *Ecotossicologia. Trattato di tossicologia e terapia*. UTET, Torino.
- Weeks, J.M.** 1992. Copper-rich granules in the ventral caeca of talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda; Talitridae). *Ophelia*, **36**, 119-133.
- Weeks, J.M. & Rainbow, P.S.** 1991. The uptake and accumulation of zinc and copper from solution by two species of talitrid amphipods (Crustacea). *Journal of the Marine Biological Association of UK*, **45**, 811-826.
- Weeks, J.M. & Rainbow, P.S.** 1993a. Interspecific comparisons of relative assimilation efficiencies for zinc and cadmium in an ecological series of talitrid amphipods (Crustacea). *Oecologia*, **97**, 228-235.
- Weeks, J.M. & Rainbow, P.S.** 1993b. The relative importance of food and seawater as sources of copper and zinc to talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda; Talitridae). *Journal of Applied Ecology*, **30**, 722-735.
- Wildish, D.J.** 1988. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology*, **66** (11), 2340-2359.
- Williams, J.A.** 1995. Burrow-zone distribution of the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* on Derbyhaven Beach, Isle of Man: a possible mechanism for regulating dessication stress? *Journal of Crustacean Biology*, **15**, 466-475.
- Williamson, D.I.** 1951. Studies on the biology of the Talitridae (Crustacea, Amphipoda): visual orientation in *Talitrus saltator*. *Journal of the Marine Biological Association of UK*, **30**, 91-99.
- Williamson, D.I.** 1954. Landward and seaward movements of the sand-hopper *Talitrus saltator*. *Advancement in Science*, **11**, 71-73.
- Zuloaga, O., Prieto, A., Usobiaga, A., Sarkar, S.K., Chatterjee, M., Bhattacharya, B. D., Bhattacharya, A., Alam, Md.A. & Satpathy, K.K.** 2009. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in intertidal marine bivalves of Sunderban Mangrove Wetland, India: an approach to bioindicator species. *Water, Air, and Soil Pollution*, **201**, 305-318.

## CAPITOLO 2

### **Trace metals accumulation in the Mediterranean beachflea *Orchestia montagui* (Audouin) (Crustacea, Amphipoda) in the Tuscan Archipelago National Park**

---

I risultati presentati nel seguente capitolo sono stati ottenuti in collaborazione con il Dott. F. Rugi (Dipartimento di Chimica, Università di Firenze), il Dott. D. Baroni (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena) e il Prof. A. Ugolini.





## ABSTRACT

We investigated the trace metals accumulation ability of the Mediterranean beachflea *Orchestia montagui*. Samplings were performed at thirteen localities along the coast of three islands belonging to the National Park of Tuscan Archipelago and the concentration of twelve trace metals (Al, Fe, Cu, Zn, Hg, Cd, Pb, Cr, Mn, Ni, As and V) in adult Amphipods and in stranded *Posidonia oceanica* was analyzed. Results show a positive correlation between Cu, Al, and Pb concentrations in *O. montagui* and stranded *P. oceanica*; moreover, the concentrations of Hg, Cd, Zn and Cu are higher in beachfleas than in the *Posidonia*. Therefore this species could be considered a good bioindicator of supralittoral zone independently from the type of substratum.

## 1. INTRODUCTION

Coastal areas are subjected to a strong input of contaminants from various sources: terrestrial, fluvial and marine. The presence of trace metals on the coastal areas is serious threat for natural ecosystems due to their high persistence, difficult biodegradation and tendency to accumulate in living organisms (Ikem and Egiebor, 2005).

Many studies on submerged and intertidal littoral environments of hard and soft substrata have dealt with the use of organisms as bioindicators of trace metal contaminations (e.g. see Rainbow and Phillips, 1993). Among the great number of organisms proposed as biomonitor of environmental pollution, talitrid Amphipods have been taken into account particularly for trace metals contamination (see Marsden and Rainbow, 2004 for a review). In fact, studies carried out on the Baltic coasts of Poland (Rainbow et al. 1989; Fialkowski et al. 2000, 2003), on Mediterranean shores (Ugolini et al., 2004, 2005, 2008) and on South Pacific coasts (see Marsden et al. 2003, Marsden and Rainbow, 2004) have demonstrated that various species of sandhoppers and beachfleas are good bioindicators for trace metals contamination (mainly Cu, Zn, Cd, Fe, Al, Hg, Mn and Ni).

The supralittoral is the zone where the major consumers of organic matter, i.e. talitrid Amphipods and Isopods, find shelter during the day buried in the wet sand or under the stranded material. Talitrid Amphipods, one of the major animal components in terms of biomass of the supralittoral environment, play an important role in the energy flow among the ecosystem because they feed on plant and animal organic matter of marine and terrestrial origin and constitute nourishment for many species of beetles, fishes, birds and mammals too (e.g. see Palluault, 1954; Branch and Branch, 1981; Griffiths et al. 1983; Wildish, 1988; Bergerard, 1989; Adin and Riera, 2003; Dugan et al., 2003; Brown and McLachlan, 2006; Ince et al., 2007).

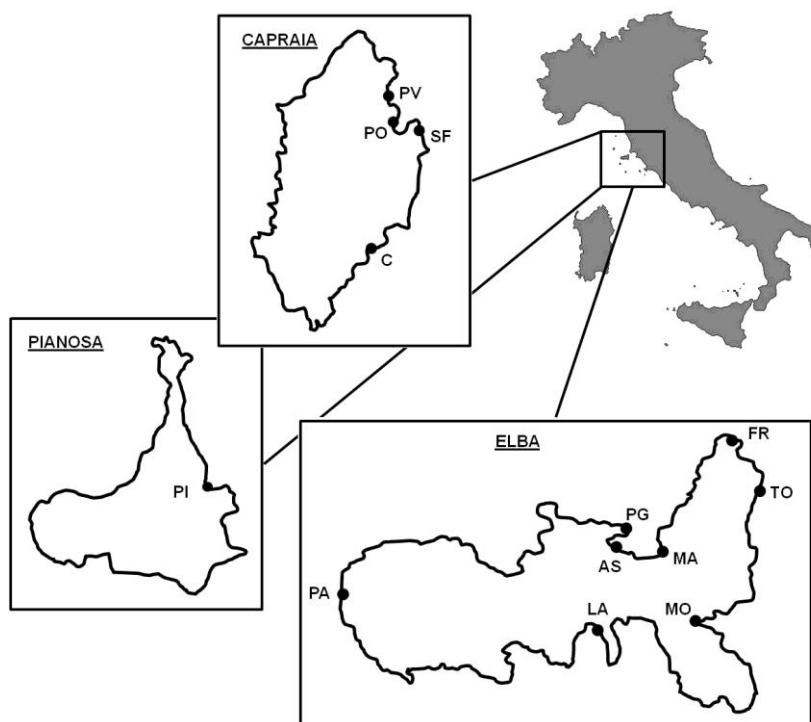
Sandhoppers are present on sandy beaches with medium and fine grain size and scarce presence of stranded vegetables (Ugolini et al., 1995), whilst beachfleas (*Orchestia*) can live in *Posidonia oceanica* banquettes formed on sandy or stony beaches or directly on hard substrata, in fact their presence is often related to the *Posidonia* banquettes or other stranded vegetables (macroalgae). The knowledge on the bioaccumulation capacity of trace metals in Mediterranean beachfleas is still scanty, but it is known that *Orchestia gammarellus* accumulates Cu and Zn as well as *Platorchestia platensis*, a cosmopolitan talitrid Amphipod (see Marsden and Rainbow, 2004 for a review). Moreover, two widespread New Zealand talitrid Amphipods, *Talorchestia quoyana* and *Orchestia tenuis*, appear to be suitable for use as biomonitors of Cu, Zn and Cd bioavailabilities (Rainbow et al., 1993).

Since the presence of beachfleas appears largely independent from the type of substratum, it seems that bioaccumulation of trace metals in some species of the genus *Orchestia* could give the possibility of comparison between localities regardless of the substratum. Therefore, in this paper we analyse the possibility to use *Orchestia montagui* (Audouin), one of the most common species of Mediterranean beachfleas, as bioindicator for the trace metals contamination of the supralittoral zone.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Adult individuals of *Orchestia montagui* and stranded leaves of *Posidonia oceanica* were collected at 13 sites, along the coasts of three islands located within the National Park of the Tuscan Archipelago: Pianosa, Capraia and Elba (Fig.1)

- Cala Giovanna (Pianosa), PI
- Porto Vecchio (Capraia), PV
- Capraia Porto (Capraia), PO
- Cala San Francesco (Capraia), SF
- Cala Carbicina (Capraia), C
- Patresi (Elba), PA
- Magazzini (Elba), MA
- Antiche Saline (Elba), AS
- Portoferraio-Grigolo (Elba), PG
- Topinetti (Elba), TO
- Mola-Porto Azzurro (Elba), MO
- Cavo-Frugoso (Elba), FR
- Laconella (Elba), LA



**Fig.1** Location of the sampling sites along the coasts of three Islands of Tuscan Archipelago. See text for further explanation.

Pianosa, Antiche Saline (Elba Island) and Capraia Porto (Capraia Island) samplings were performed in summer 2006, whereas at Capraia Island in August 2006 and 2007; in the other localities animals and stranded *Posidonia* were collected in summer 2008 and 2009. At the localities Topinetti and Laconella (Elba Island) the samples were collected in summer 2008.

The following trace metals were analysed in stranded *P. oceanica* and adult Amphipods:

Al, Fe, Cu, Zn, Hg, Cd, Pb, Cr, Mn, Ni, As and V. The animals were transported to the laboratory in plastic containers and then killed by freezing. Samples were dehydrated at 35° until they reached a constant weight and then were finely ground. About 150 mg of each sample were mineralized in Teflon vessels containing 2 ml of HNO<sub>3</sub> and 0,5 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 120° C and under pressure for 8 h. After digestion, the solution was brought to 10 ml by addition

of deionized water. Several “blank trials” were performed during each mineralization by putting only the reagents in the Teflon containers, to verify the absence of contamination.

Cd, Cr, Ni and Pb were determined with GF-AAS (atomization with a Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry). The FIMS (Flow Injection Mercury System) was used for Hg, while Al, Fe, Zn, Mn and Cu were analysed with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-EAS). For As and V data are available only for six localities because samples were determined by the ICP-AES VARIAN 720, with the internal standard method, at our disposal only recently.

The accuracy of the analytical procedures was assessed by comparing the results of contemporary digestions and analyses of standard reference materials, SRMs: SRM 1566a “Oyster Tissue” from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA) . The element concentrations (expressed as  $\mu\text{g/g}$  dry weight) were calculated by the method of “internal additions”. The precision, expressed as relative standard deviation from five separate digestions of the same sample, was in the range 5-10%.

### **Statistical analysis**

We evaluated the relationship between metals concentration in the stranded leaves of *P. oceanica* and beachfleas by the Spearman rank-order correlation coefficient test (Siegel and Castellan, 1989). Moreover, if the correlation did not reach the statistical significance, the concentration of trace metals in *O. montagui* with respect to *P. oceanica* was compared with the Sign test (Siegel and Castellan, 1989). We used the Kruskal–Wallis test, a non-parametric analysis of variance, to assess if there were some differences among the concentrations of trace metals in the animals related both to the different localities of sampling within each island either among the different islands. In the Kruskal-Wallis test, for those localities where the samples were collected for more the one season, we did not use the mean trace metals concentrations but raw data.

### 3. RESULTS

The mean concentrations (with standard deviations) of trace metals in *O. montagui* and stranded leaves of *P. oceanica* are given in Tables 1 and 2, respectively.

The correlation between the trace metals concentrations in the Amphipods and stranded *Posidonia* (Fig.2) was significant for Cu, Al and Pb (Spearman rank-order correlation coefficient test, Cu:  $r_s=0.594$ ,  $p<0.05$ ; Al:  $r_s=0.720$ ,  $p<0.01$ ; Pb:  $r_s=0.688$ ,  $p<0.02$ ). The correlation between the Cd and Mn concentrations in beachfleas and stranded *P. oceanica* did not reach the full statistical significance (Spearman rank-order correlation coefficient test, Cd:  $r_s=0.539$ ,  $0.1<p<0.05$ ; Mn:  $r_s=0.550$ ,  $0.1<p<0.05$ ).

Moreover, even though the correlation did not reach the statistical significance, the concentrations of Hg, Cd and Zn were constantly higher in *O. montagui* than in the stranded *P. oceanica* (Hg:  $n=12$ ,  $x=2$ ,  $p=0.019$ ; Cd:  $n=13$ ,  $x=3$ ,  $p=0.046$ ; Zn:  $n=13$ ,  $x=1$ ,  $p=0.002$ ; Sign test). Instead, the Cr, Ni and V contents (Fig.2) were higher in the stranded *Posidonia* than in the beachfleas (Sign test, Cr:  $n=13$ ,  $x=3$ ,  $p=0.046$ ; Ni:  $n=10$ ,  $x=1$ ,  $p=0.011$ ; V:  $n=5$ ,  $x=0$ ,  $p=0.031$ ).

For the Fe statistical significance was not reached in any case: a higher concentration of this metal in beachfleas occurred at 4 sites, while the concentration was higher in stranded *Posidonia* at the other localities. The statistical significance was not reached also for the As. However it is worthy to note that the concentration of this metal in *O. montagui* was about tenfold higher than in the stranded *P. oceanica* at 4 sites out of 5.

The sampling sites situated near the harbours of the two bigger islands (Elba: Magazzini, Antiche Saline, Portoferraio-Grigolo and Mola-Porto Azzurro; Capraia: Capraia Porto) showed a higher concentration of Pb, Cr, Fe and Al both in beachfleas and stranded *P. oceanica* (see Tables 1 and 2) than the other localities. Moreover, at the locality of Topinetti the trace metals concentrations were very high in *O. montagui* (Hg, Zn, Fe, Pb, Cr, Ni) and stranded organic material (Hg, Cd, Zn) with respect to the other sampling sites. Nevertheless, the Kruskal-Wallis test showed that, for each metal analysed, there were no statistical differences among localities of the same island in beachfleas trace metals concentrations (Sampling sites of Capraia Island: Hg, Cd, Zn, Cu, Al, Fe, Pb, Cr, Mn,  $df=3$ ,  $n=7$ ,  $H_{max}=4.83$ ,  $p=NS$ ; Ni,  $df=2$ ,  $n=3$ ,  $H=2.00$ ,  $p=NS$ ; sampling sites of Elba Island: Hg, Cd, Zn, Cu, Al, Fe, Pb, Cr, Mn,  $df=7$ ,  $n=13$ ,  $H_{max}=10.97$ ,  $p=NS$ ; Ni,  $df=6$ ,  $n=12$ ,  $H=8.79$ ,  $p=NS$ ; As, V,  $df=4$ ,  $n=5$ ,  $H=4.00$ ,  $p=NS$ . Kruskal-Wallis test).

The comparison among the trace metals concentrations in the animals from the three island, instead, showed a statistical significance for Zn, Cu, Al and Mn (Kruskal-Wallis test,  $df=2$ ,  $n=21$ . Zn:  $H=6.307$ ,  $p<0.05$ ; Cu:  $H=6.439$ ,  $p<0.05$ ; Al:  $H=8.482$ ,  $p<0.02$ ; Mn:  $H=10.087$ ,  $p<0.01$ ) (Fig.3). At Pianosa Island the trace metals concentration in beachfleas is almost always (except for Ni) lower than at the other two Islands. Zn, Al and Mn are more bioconcentrated in

**Tab.1**

Trace metals in *O. montagu*: mean and SD in mg/kg dry weight

Location	Hg	Cd	Zn	Cu	Fe	Al	Pb	Cr	Mn	Ni
PI (Caia Giovanna, Pianosa)	0.08	0.33	64	54	240	26	0.2	0.8	3.8	-
PV (Porto Vecchio, Capraia)	0.1 (0.014)	0.54 (0.04)	85.5 (20.51)	91.5 (28.99)	229.5 (33.23)	46.05 (42.36)	0.35 (0.35)	0.8 (0.14)	8.3 (6.65)	4.9
PO (Capraia Porto, Capraia)	0.12	0.11	97	100	469	132	0.7	1.3	5.1	-
SF (Caia San Francesco, Capraia)	0.075 (0.05)	0.545 (0.11)	96.5 (7.78)	89 (8.49)	266 (67.88)	51 (7.07)	0.4 (0.28)	0.8 (0.14)	10.2 (4.53)	3.5
C (Caia Carbicina, Capraia)	0.08 (0.035)	0.74 (0.37)	93 (11.31)	76 (18.38)	446 (111.72)	158 (52.33)	0.4 (0.00)	1.15 (0.21)	9.95 (0.07)	3.7
PA (Pianesi, Elba)	0.083 (0.04)	1.09 (0.18)	96.05 (4.16)	66.8 (0.70)	90.14 (42.22)	77.75 (53.33)	0.35 (0.06)	0.73 (0.52)	6.92 (1.31)	1.86 (0.90)
MA (Magazzini, Elba)	0.074 (0.05)	0.16 (0.35)	105 (1.35)	73.1 (3.80)	192 (11.23)	192 (59.81)	0.7 (0.11)	0.9 (0.52)	16 (12.80)	1.3 (0.28)
AS (Antiche Saline, Elba)	0.17	0.45	102	106	1040	655	2.3	4.1	72	-
PG (Ponderralo-Grigolo, Elba)	0.14 (0.07)	0.38 (0.45)	137 (14.06)	73.6 (0.20)	1619 (925.63)	1028 (571.15)	2.2 (0.81)	3.9 (1.80)	27 (0.80)	5.4 (1.69)
TO (Topinetti, Elba)	0.2	0.5	141.6	81.7	13940.8	1035.7	3.6	14.6	51.9	25.2
MO (Mola-Porto Azzurro, Elba)	0.063 (0.01)	0.12 (0.41)	105 (10.20)	67.2 (3.33)	785 (164.90)	1485 (114.68)	0.6 (0.35)	1.8 (0.62)	24 (23.64)	2.2 (0.16)
FR (Cavo-Fuggaso, Elba)	0.07 (0.04)	0.4 (0.28)	99 (4.99)	64.6 (2.55)	154 (141.92)	77 (145.71)	0.3 (0.08)	0.8 (0.08)	17 (38.45)	1.4 (0.21)
LA (Lacconella, Elba)	0.1	0.48	101.6	66.7	527	459	0.4	1.4	31.1	2.2

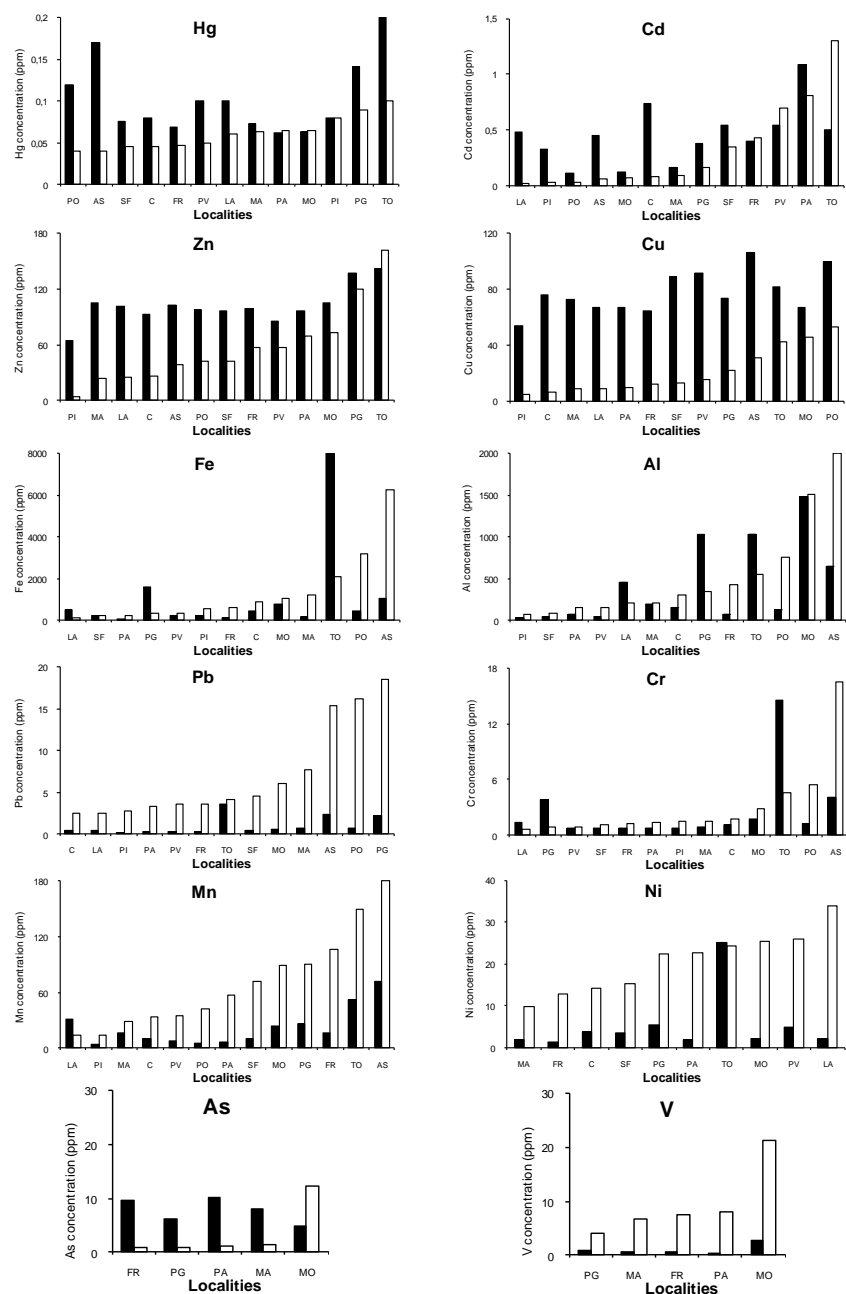
**Tab.2**

Trace metals in stranded *P. oceanica*: mean and SD in mg/kg dry weight

Location	Hg	Cd	Zn	Cu	Fe	Al	Pb	Cr	Mn	Ni
PI (Caia Giovanna, Pianosa)	0.08	0.03	4.4	4.6	549	79	2.7	1.5	14.6	-
PV (Porto Vecchio, Capraia)	0.05 (0.035)	0.7 (0.86)	57.5 (65.76)	15.1 (13.44)	367.5 (85.56)	152.5 (105.60)	3.6 (1.56)	0.95 (0.21)	35.15 (39.39)	26
PO (Capraia Porto, Capraia)	0.04	0.03	42	53	3176	753	16.2	5.4	42	-
SF (Caia San Francesco, Capraia)	0.045 (0.007)	0.35 (0.34)	42 (2.83)	12.9 (5.80)	252.5 (75.66)	90 (48.08)	4.6 (1.88)	1.1 (0.42)	72.5 (30.41)	15.3
C (Caia Carbicina, Capraia)	0.045 (0.007)	0.08 (0.04)	26 (18.38)	6.55 (0.78)	906.5 (919.95)	310 (354.97)	2.5 (0.85)	1.7 (1.27)	33.5 (27.58)	14.1
PA (Pianesi, Elba)	0.066 (0.02)	0.805 (0.67)	69.75 (46.31)	9.78 (4.97)	256.29 (61.81)	151.15 (63.46)	3.32 (1.52)	1.42 (0.53)	57.31 (34.38)	22.73 (6.39)
MA (Magazzini, Elba)	0.064 (0.01)	0.09 (0.33)	24 (118.53)	8.5 (1.20)	1249 (881.01)	207 (34.56)	7.7 (3.86)	1.5 (0.13)	29 (85.52)	9.9 (8.46)
AS (Antiche Saline, Elba)	0.04	0.06	38	31	6270	7053	15.4	16.5	279	-
PG (Ponderralo-Grigolo, Elba)	0.09 (0.04)	0.16 (0.45)	120 (5.53)	22.1 (6.52)	324 (79.45)	342 (127.24)	18.5 (8.53)	0.9 (0.03)	80 (28.31)	22.3 (0.33)
TO (Topinetti, Elba)	0.1	1.3	162.1	42.4	2119	549	4.1	4.6	251.5	24.3
MO (Mola-Porto Azzurro, Elba)	0.065 (0.02)	0.07 (0.52)	73 (5.21)	45.7 (9.35)	1072 (3350.03)	1508 (4594.96)	6.1 (3.66)	2.8 (8.86)	89 (125.96)	25.3 (2.89)
FR (Cavo-Fuggaso, Elba)	0.05 (0.03)	0.43 (0.17)	57 (26.26)	12 (1.83)	613 (240.44)	431 (231.91)	3.6 (1.32)	1.2 (0.47)	106 (57.92)	12.9 (1.45)
LA (Lacconella, Elba)	0.06	0.02	24.7	8.6	143	204	2.5	0.7	13.7	34

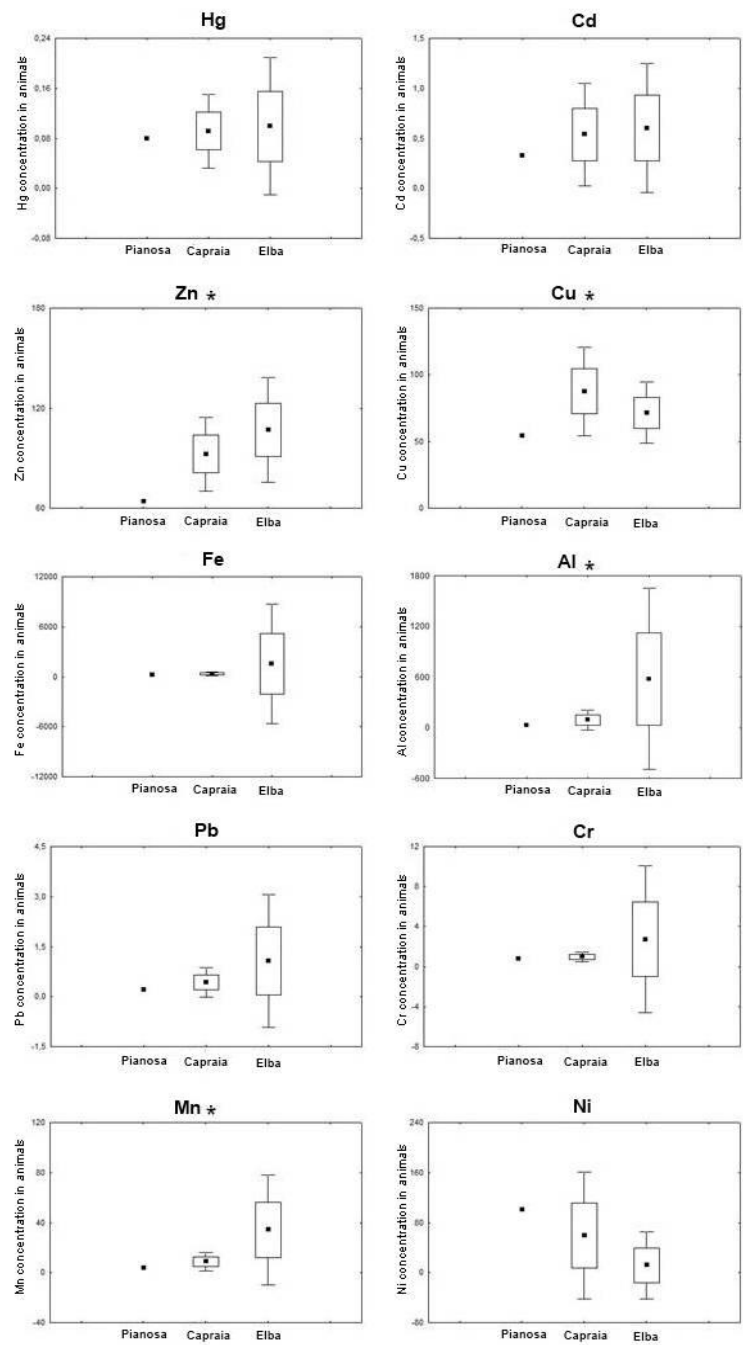
**Tab. 1** Mean concentration of trace metals in the beachflea *Orchestia montagu* collected at various sampling sites in the Tuscan Archipelago (mg/kg dry weight). Standard deviation values are bracketed. For those localities where samples were collected only for one season we reported the concentration of the metals in that period.

**Tab. 2** Mean concentration of trace metals in stranded *P. oceanica* collected at various sampling sites in the Tuscan Archipelago (mg/kg dry weight). For further explanations see Tab. 1.



**Fig.2** Trace metal concentrations (mg/kg dry weight) in the stranded *P. oceanica* (white bars) and in the beachfleas (black bars). For those localities where samples were collected for two season we reported the mean concentration of the metals. For each element, the localities are arranged in increasing order of metal concentration in the stranded *P. oceanica*. For further explanations see Fig. 1.

*O. montagui* collected at Elba Island, instead the concentration of Cu in the animals is higher at Capraia Island.





**Fig.3** Trace metals concentration in *O. montagui* in the three islands Pianosa, Capraia and Elba. For every island is shown the mean metal concentration of the sampling sites. Central point, mean metal concentration; box width, standard deviation around the mean; whiskers, mean  $\pm$  1,96 standard deviation. Pianosa n = 1, Capraia n = 7 and Elba n = 13. Asterisk indicates that trace metal concentration in beachfleas is significantly different among the islands (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$  at least. See text for further explanations).

#### 4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Our results show that *O. montagui* can easily accumulate Hg, Cd, Zn, Cu, Al and Pb. Further samplings are needed to assess if *O. montagui* can accumulate As, because even though the concentration of this heavy metal in the largest part of localities is really high compared to that in *P. oceanica*, there was no statistical difference, probably caused by the few number of sampling sites.

The comparison of the mean trace metals concentration in the animals from the three island show a difference among the areas of sampling only for four metals out of twelve (Zn, Cu, Al, Mn). These findings give us an indication of a different contamination of these three areas probably due to a different anthropogenic impact which increase from Pianosa, to Capraia and finally to Elba Island. The number of sampling sites is clearly different among the three islands, with only a single locality at Pianosa, for this reason further sampling are needed to confirm a real difference in trace metals concentration among these three islands.

The study area is characterized by different anthropic impact mainly due to touristic and harbor activities, potential sources of metals in the environment. Moreover, Elba Island has a peculiar geological composition, with a great presence of ferrous minerals, which brought to an extensive mining fruition and ironworks activities for about three thousand years. The iron mines are not active any more but a lot of ferrous minerals are still present throughout the territory and this is probably the reason of the high concentrations of this metal both in *O. montagui* and stranded *P. oceanica* leaves. Consequently, the elevated trace metals concentrations at the locality of Topinetti is for the most

part due to the mines located in the zone of Rio Marina and Cavo. In addition to the natural presence of some trace metals in this area, the existence of harbours probably affect and increase the heavy metals in the environment, as suggested from results of trace metals concentration in beachfleas and stranded *P. oceanica* sampled near the major harbours of Elba Island but also of Capraia Island.

Moreover, the geological feature of Elba Island could influence the trace metals availability in the natural environment.

Therefore, because of the wide diffusion of this species and the capability to accumulate trace metals, the beachflea *O. montagui* could also be considered as a good bioindicator of trace metals contamination of the supralittoral zone of sandy and rocky shores.

### **Acknowledgements**

We wish to thank Dr. F.Zanichelli (director) and F. Giannini (biologist) of the National Park of the Tuscan Archipelago for the authorization to sampling. The research was financially supported by the Fondazione Monte Paschi (Siena).

## 5. REFERENCES

- Adin, R. & Riera, P.** 2003. Preferential food source utilization among stranded macroalgae by *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae): a stable isotopes study in the northern coast of Brittany (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **56**, 91–98.
- Bergerard, J.** 1989. Ecologie des laisses de marée. *L'année Biologique*, **28** (1), 39-54.
- Branch, G. & Branch, M.** 1981. *The Living Shores of Southern Africa*. G. Struik Publication, Cape Town, South Africa.
- Brown, A.C. & McLachlan, A.** 2006. *Ecology of Sandy Shores*. Elsevier, Amsterdam.
- Dugan, J.E., Hubbard, D.M., McCrary, M.D. & Pierson, M.O.** 2003. The response of macrofauna communities and shorebirds to macrophyte wrack subsidies on exposed sandy beaches of southern California. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **58S**, 25-40.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183-192.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Zmudzinski, L.** 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 81-93.
- Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K.** 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (McLachlan, A. and Erasmus, T. Eds.), pp. 547-556, W. Junk, The Hague.
- Ikem, A. & Egiebor, N.O.** 2005. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 771–787.
- Ince, R., Hyndes, G., Lavery, P.S. & Vanderklift, M.A.** 2007. Marine macrophytes directly enhance abundance of sandy beach fauna through provision of food and habitat. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **74**, 77–86.
- Marsden, I.D., Rainbow, P.S. & Smith, B.D.** 2003. Trace metal concentration in two New Zealand talitrid amphipods: effects of gender and reproductive state and implication for biomonitoring. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **290**, 93-113.
- Marsden, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in Crustaceans affect their ecology-the Amphipods example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.

- Palluault, M.** 1954. Notes ecologiques sur le *Talitrus saltator*. *Archives de Zoologie Experimentale et Générale*, **91**, 105-129.
- Rainbow, P.S. & Phillips, D.J.H.** 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **26**, 593-601.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **28**, 567-582.
- Rainbow, P.S., Emson, R.H., Smith, B.D., Moore, P.G. & Mladenov, P.V.** 1993. Talitrid amphipods as biomonitors of trace metals near Dunedin, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **27**, 201-207.
- Siegel, S. & Castellan Jr, J.N.** 1989. Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences, 2<sup>nd</sup> Ed. McGraw Hill, New York.
- Ugolini, A., Felicioni, S., Ruffo, S. & Cipriani, L.** 1995. Distribution of *Talorchestia ugolinii* and other sandhoppers in Corsica. *Italian Journal of Zoology*, **62**, 291—296.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of the heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhoppers species: *Talitrus saltator* Montagu and *Talorchestia ugolinii* Bellan Santini and Ruffo. *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaporti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349-357.
- Wildish, D.J.** 1988. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology*, **66** (11), 2340-2359.

# CAPITOLO 3

## **Variazione stagionale nell'accumulo di metalli in traccia in *Orchestia montagui* (Audouin) (Crustacea, Amphipoda)**

---

I risultati presentati nel seguente capitolo sono stati ottenuti in collaborazione con il Dott. F. Rugi e il Prof. R. Udisti (Dipartimento di Chimica, Università di Firenze), il Dott. D. Baroni (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena) e il Prof. A. Ugolini.



## 1. INTRODUZIONE

Numerosi studi hanno dimostrato che molte specie di Anfipodi talitridi risultano buoni bioindicatori della contaminazione da metalli in traccia (Phillips e Rainbow, 1994; Rainbow, 1995, 1999; Marsden e Rainbow, 2004; Ugolini e Ungherese, 2011).

In particolare, l'Anfipode cosmopolita *Platorchestia platensis* è stato impiegato come bioindicatore della contaminazione da Cu e Zn (si veda Marsden e Rainbow, 2004 per una revisione), mentre due specie di Anfipodi talitridi Neozelandesi ampiamente diffuse, *Talorchestia quoyana* e *Orchestia tenuis*, sembrano poter essere utilizzate come biomonitori della biodisponibilità di Cu, Zn e Cd (Rainbow et al., 1993). In Europa *Talitrus saltator* e *Orchestia gammarellus* sono stati ampiamente proposti come bioindicatori della contaminazione da metalli in traccia nella fascia sopralitorale (Moore e Rainbow, 1987; Rainbow et al., 1989, 1998, 1999; Moore et al., 1991; Fialkowski et al., 2000, 2003, 2009; Ugolini et al., 2004, 2005).

Tuttavia, tra i molti fattori che possono influire sulla concentrazione di metalli in traccia negli anfipodi, le differenze stagionali non sono state indagate in modo esteso (Rainbow e Moore, 1990; Fialkowski et al., 2003).

Rainbow e Moore (1990) hanno studiato come varia la concentrazione di rame e zinco nell'arco dell'anno in *O. gammarellus*, *Orchestia mediterranea* e in *T. saltator* della Scozia occidentale, osservando che in tutte e tre le specie la concentrazione di Cu si riduce drasticamente nel periodo invernale rispetto al resto dell'anno, mentre non hanno registrato variazioni stagionali per quanto riguarda lo Zn.

Fialkowski e collaboratori (2003) hanno studiato la variazione stagionale nell'accumulo di Cd, Fe, Mn, Pb e Ni, così come di Cu e Zn, in *T. saltator*, *Orchestia cavimana* e *Deshayesorchestia deshayesii* nel Golfo di Gdansk, in Polonia, un'area con una considerevole differenza di temperatura tra il periodo estivo e quello invernale. I risultati hanno confermato una variazione stagionale della concentrazione dei metalli negli animali, anche se solo il Cu ha mostrato un andamento costante: la diminuzione della concentrazione di tale metallo da inizio a fine estate, in contrasto con quanto evidenziato da Rainbow e Moore (1990).

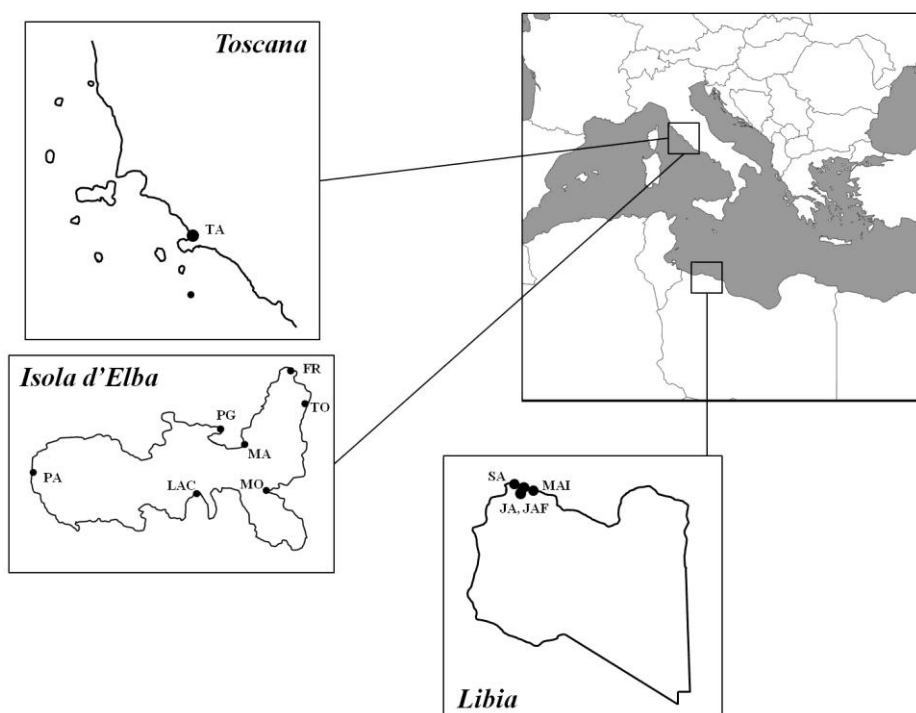
Gli anfipodi talitridi sono generalmente attivi dalla primavera fino a metà autunno, mentre il resto dell'anno rimangono inattivi in uno stato di torpore nei loro rifugi scavati nella sabbia. Tale comportamento riflette lo stato fisiologico degli animali, i quali abbassando il tasso metabolico riducono anche il consumo di ossigeno legato all'emocianina, pigmento respiratorio presente nella loro emolinfa, con una conseguente diminuzione della concentrazione di Cu (Rainbow e Moore, 1990; Fialkowski et al., 2003; Marsden e Rainbow, 2004).

Pertanto, lo scopo del presente lavoro consiste nell'approfondire la valutazione dell'influenza della stagionalità sulla concentrazione dei metalli in traccia in anfipodi sopralitorali. Le analisi sono state effettuate su *Orchestia*

*montagui* (Audouin), una specie che vive nel bacino del Mediterraneo, la cui presenza è legata alle banquettes di *Posidonia oceanica* o ad altro materiale organico spiaggiato. Questo potrebbe permettere la comparazione della contaminazione da metalli in traccia di località costiere indipendentemente dal tipo di substrato.

## 2. MATERIALI E METODI

Individui adulti di *O. montagui* e campioni di *Posidonia oceanica* (L.) Delile spiaggiata sono stati raccolti in 12 località sulle coste della Toscana, dell'isola d'Elba e della Libia. I campionamenti sono stati effettuati in tre periodi dell'anno: estate 2008 e 2009 (11 località), autunno 2008 (7 località) ed inverno 2008 e 2009 (6 località). Nella località di Cavo-Frugoso (isola d'Elba) è stato possibile effettuare la raccolta invernale di anfipodi e materiale spiaggiato solo nel 2009, mentre a Topinetti i campionamenti sono stati effettuati solo nel 2008.



**Fig.1** Località di campionamento situate sulle coste della Toscana, Isola d'Elba e Libia. TA, Talamone; PA, Patresi; PG, Portoferraio-Grigolo; MA, Magazzini; FR, Cavo-Frugoso; TO, Topinetti; MO, Mola-Porto Azzurro; LAC, Laconella; SA, Sabratha; JA, Jamsur; JAF, Jamsur Fish Factory; MAI, Maitiga.



I campioni raccolti sono stati portati in laboratorio, congelati a -20°C e disidratati a 35°C fino al raggiungimento di un peso costante. Circa 150 mg di ogni campione sono stati mineralizzati sotto pressione alla temperatura di 120°C in contenitori di Teflon contenenti 2 ml di HNO<sub>3</sub> e 0,5 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dopo la digestione, la soluzione è stata portata al volume di 10 ml aggiungendo acqua deionizzata. Durante ogni mineralizzazione sono state effettuate numerose prove “in bianco” ponendo nei contenitori di Teflon solo i reagenti, in modo da verificare l'assenza di contaminazione. I metalli in traccia analizzati negli anfipodi e in *P. oceanica* sono: Hg, Cd, Zn, Cu, Fe, Al, Pb, Cr, Mn, Ni e per alcuni campioni anche As e V. Le analisi sono state effettuate tramite spettrometria ad assorbimento atomico: Zn, Cu, Fe, Al e Mn sono stati determinati con lo spettrometro di emissione al Plasma (ICP/EAS, “Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry”), Cd, Pb, Cr e Ni attraverso atomizzazione con fornetto di grafite e correttore di fondo Zeeman, mentre Hg mediante la tecnica a vapori freddi (FIMS, “Flow Injection Mercury System”).

La concentrazione del Mn non è stata analizzata nei campioni delle località libiche, mentre la concentrazione di As e V è stata analizzata in un minor numero di località in quanto il contenuto di questi due metalli nei campioni è stato determinato con lo strumento ICP-AES VARIAN 720, con il metodo dello standard interno, a nostra disposizione solo recentemente.

La relazione tra la concentrazione dei metalli in traccia in *O. montagui* e nelle foglie spiaggiate di *P. oceanica* è stata saggiata attraverso il test di correlazione di Spearman per ranghi (Siegel e Castellan, 1989). Inoltre, quando la correlazione non raggiungeva la significatività statistica, la concentrazione dei metalli negli animali e in *P. oceanica* è stata confrontata con il Sign test (Siegel e Castellan, 1989).

Per valutare eventuali differenze stagionali nell'accumulo dei metalli i fattori di bioaccumulo ( $BAF = C_b/C_s$ ;  $C_b$ , concentrazione del metallo nel biota;  $C_s$ , concentrazione del metallo nel substrato) di estate, autunno ed inverno sono stati confrontati tramite il Mann-Whitney test (Zar, 1984).

### 3. RISULTATI

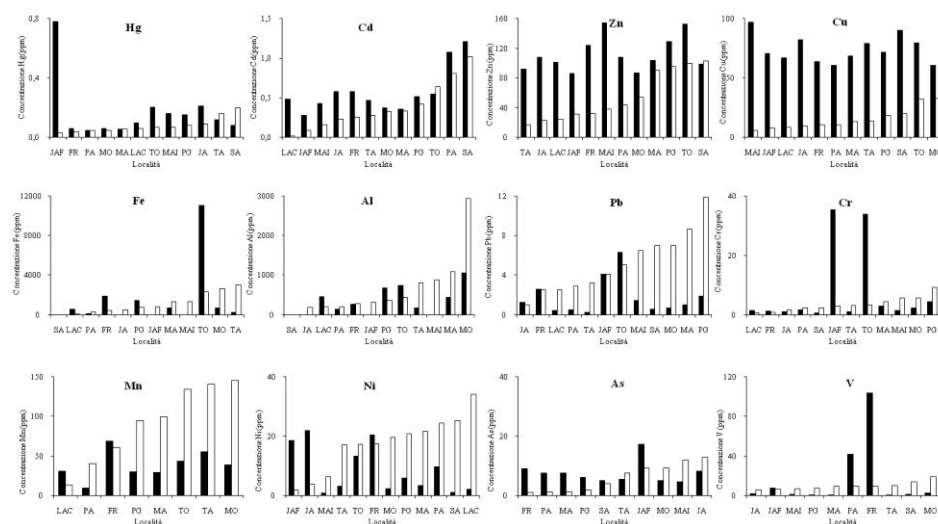
La correlazione tra la concentrazione media dei metalli in traccia negli anfipodi e nella *Posidonia* spiaggiata non è risultata significativa per nessun metallo ( $r_{s\ max}=0.524$ ,  $p=NS$ . Test di correlazione di Spearman). Tuttavia, le concentrazioni di Cd, Zn e Cu sono risultate maggiori negli animali rispetto a *P. oceanica* (Cd, Zn:  $n=12$ ,  $x=1$ ,  $p=0.003$ ; Cu:  $n=12$ ,  $x=0$ ,  $p<0.003$ . Sign test), mentre per Mn non è stata raggiunta la piena significatività statistica ( $n=10$ ,  $x=2$ ,  $p=0.055$ . Sign test) (Fig.2).

Esaminando le concentrazioni dei metalli in *O. montagui* e nella *Posidonia* spiaggiata in base alla stagione di raccolta, è emersa una correlazione statisticamente significativa per Hg, Cu e Cr (Hg:  $r_s=0.871$ ,  $p<0.05$ ; Cu:  $r_s=0.785$ ,  $p<0.05$ ; Cr:  $r_s=0.828$ ,  $p<0.05$ . Test di correlazione di Spearman) in Autunno e per Cr (Cr:  $r_s=0.942$ ,  $p<0.05$ . Test di correlazione di Spearman) in Inverno (Tab.1).

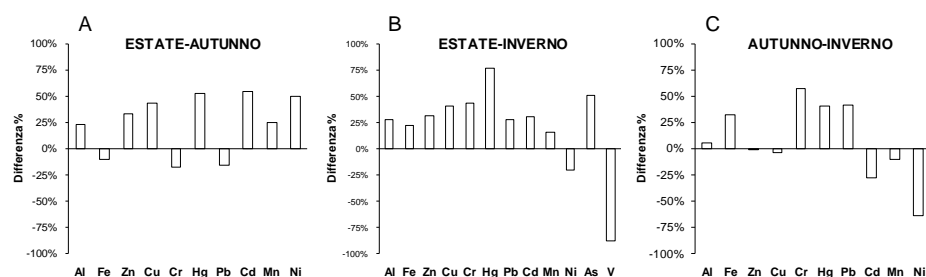
Inoltre, nonostante la correlazione non abbia raggiunto la significatività statistica, nel periodo estivo la concentrazione di Cd e Cu è risultata sempre maggiore in *O. montagui* rispetto a *P. oceanica* (Cd:  $n=11$ ,  $x=2$ ,  $p<0.05$ ; Cu:  $n=11$ ,  $x=0$ ,  $p<0.01$ . Sign test), mentre quella di Pb, Mn e V era più elevata nella fanerogama spiaggiata (Pb:  $n=11$ ,  $x=1$ ,  $p<0.01$ ; Mn:  $n=7$ ,  $x=0$ ,  $p<0.01$ ; V:  $n=10$ ,  $x=1$ ,  $p<0.02$ . Sign test). In autunno, invece, la concentrazione negli animali è risultata più alta rispetto alla *Posidonia* per Hg, Cd, Zn e Cu ( $n=7$ ,  $x=0$ ,  $p<0.01$ . Sign test) mentre è stata rilevata la situazione contraria, con un maggior accumulo della *Posidonia* spiaggiata rispetto agli anfipodi, per quanto riguarda il Ni ( $n=7$ ,  $x=0$ ,  $p<0.01$ . Sign test). Infine, i campionamenti dei mesi invernali hanno mostrato che Zn e Cu vengono concentrati maggiormente in *O. montagui* ( $n=6$ ,  $x=0$ ,  $p<0.02$ . Sign test), mentre Pb nella *P. oceanica* spiaggiata ( $n=6$ ,  $x=0$ ,  $p<0.02$ . Sign test) (Tab.1).

Prendendo in esame la concentrazione dei vari metalli in traccia negli anfipodi per le località in cui è stato possibile effettuare i campionamenti in tutte e tre le stagioni o, per quanto riguarda As e V, 2 stagioni (Fig.3), non sono emerse differenze statisticamente significative tra estate-autunno-inverno per nessun metallo ad eccezione del Hg ( $n=18$ ,  $df=2$ ,  $H=6.78$ ,  $p<0.05$ . Kruskal-Wallis test) il quale risulta sempre presente in concentrazioni maggiori in periodo autunnale.

In Fig.3 sono riportate le differenze delle concentrazioni dei metalli nelle orchestrie tra estate-autunno, estate-inverno e autunno-inverno, espresse in percentuale. La concentrazione di Al, Zn, Cu, Hg, Cd, Mn e Ni in estate è superiore a quella registrata negli animali nel periodo autunnale, mentre confrontando le concentrazioni estive con quelle invernali si può notare che solo il Ni e il V sono presenti in quantità più elevate in inverno. Infine, la differenza percentuale tra le concentrazioni di autunno e inverno ha mostrato una maggiore concentrazione di Al, Fe, Cr, Hg e Pb in autunno, mentre la quantità di Zn, Cu, Cr, Mn e Ni è maggiore negli anfipodi raccolti in inverno.



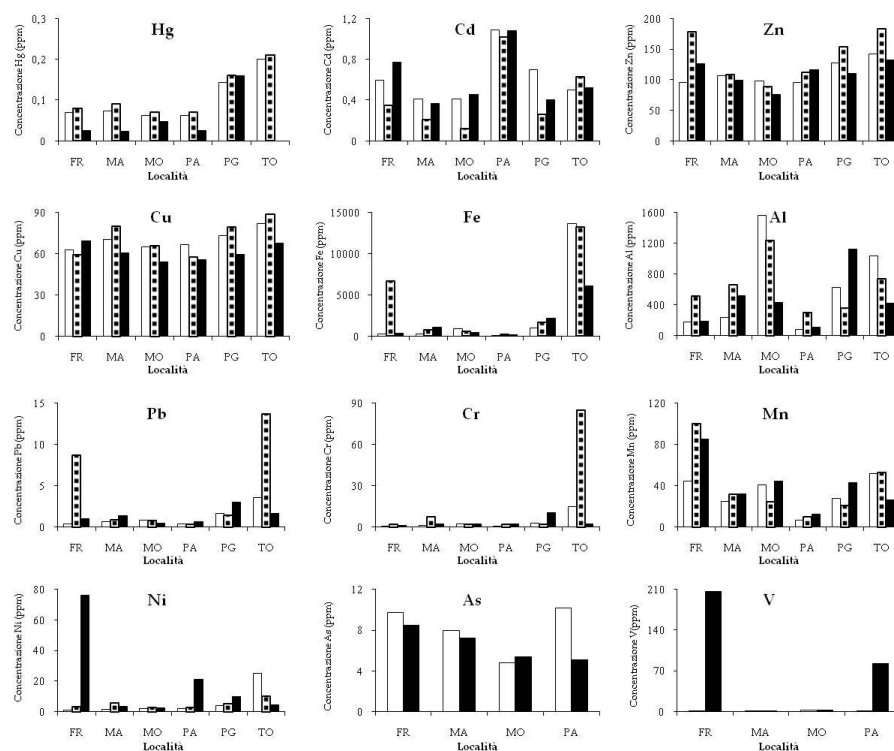
**Fig.2** Concentrazione media dei metalli in traccia (ppm) in *O. montagui* (barre nere) e *P. oceanica* spiaggiata (barre bianche). Per ogni elemento le località sono disposte in ordine crescente di concentrazione della *Posidonia* spiaggiata.



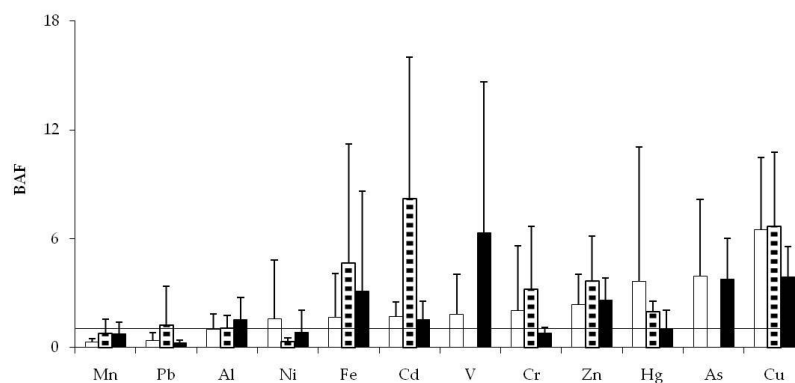
**Fig.3** Differenza percentuale della concentrazione di metalli in traccia in *O. montagui* tra le tre diverse stagioni di raccolta. I valori che ricadono nel quadrante superiore (valori positivi dell'asse delle ordinate) indicano una concentrazione maggiore negli anfipodi in estate rispetto all'autunno (A), in estate rispetto all'inverno (B), in autunno rispetto all'inverno (C).

Loc	Stag	Hg	Hg	Cd	Cd	Zn	Zn	Cu	Cu	Fe	Fe	Al	Al	Pb	Pb	Cr	Cr	Mn	Mn	Ni	Ni	As	As	V	V
		O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.	O.m.	P.o.
PA	E	0.06	0.07	1.09	0.81	96.06	69.75	66.80	97.9	90.15	256.30	151.13	77.76	0.36	3.33	0.74	1.43	6.93	57.31	1.87	22.74	10.18	1.10	0.30	7.98
	A	0.07	0.04	1.02	0.10	112.00	24.00	57.60	4.20	234.00	302.00	405.00	0.30	2.40	2.20	1.90	10.00	38.00	2.80	10.20					
	I	0.03	0.03	1.08	1.17	116.88	28.67	55.97	14.39	133.74	342.63	160.95	0.69	2.73	2.15	3.28	12.53	24.17	21.17	33.25	5.12	1.54	82.52	11.16	
MA	E	0.07	0.06	0.41	0.33	105.96	107.82	70.41	9.35	260.66	767.45	231.44	0.63	10.52	1.27	1.41	25.05	89.48	1.71	15.88	7.94	1.29	0.72	6.65	
	A	0.09	0.06	0.21	0.03	108.00	63.00	80.20	17.40	721.00	3371.00	4362.00	0.90	9.70	7.30	10.60	32.00	147.00	5.80	24.40					
	I	0.02	0.05	0.37	0.50	98.63	87.22	60.51	15.56	1105.42	836.53	299.25	1.40	6.14	2.46	4.31	32.44	84.76	3.67	26.23	7.25	1.47	1.01	11.89	
PG	E	0.14	0.09	0.70	0.48	127.06	116.02	73.46	17.49	964.48	268.53	624.14	252.03	1.63	12.47	2.63	0.88	27.57	110.02	4.21	22.54	6.20	0.89	4.03	
	A	0.16	0.13	0.26	0.05	153.20	132.90	79.30	16.20	1705.00	272.00	361.00	280.00	1.40	19.60	2.00	1.40	20.70	54.50	5.10	19.70				
	I	0.16	0.05	0.40	0.56	109.80	55.71	59.80	21.24	2218.00	1403.13	513.42	2.98	7.40	10.50	21.33	42.80	100.29	10.00	19.80					
TO	E	0.20	0.10	0.50	1.30	141.60	162.10	81.70	42.40	13640.00	2119.00	1035.70	549.00	3.60	4.10	14.60	4.60	51.90	251.50	25.20	24.30				
	A	0.21	0.08	0.63	0.47	183.00	89.00	89.00	43.50	13254.00	4635.00	741.00	631.00	13.70	6.30	85.00	3.40	53.00	127.00	10.00	13.50				
	I	0.01	0.03	0.52	0.16	132.40	47.10	67.80	10.50	6121.00	245.00	425.00	118.00	1.66	4.69	2.10	2.00	26.00	23.10	4.70	14.10				
MO	E	0.06	0.07	0.41	0.44	97.79	76.69	64.85	39.09	901.60	340.83	1566.09	4750.00	0.85	8.69	2.24	9.07	40.72	178.07	2.09	23.26	4.77	12.15	21.36	
	A	0.07	0.03	0.12	0.11	88.40	25.60	66.00	17.50	593.00	2672.00	1241.00	2691.00	0.80	3.50	2.20	3.60	24.20	77.60	2.70	6.10				
	I	0.05	0.04	0.46	0.33	76.22	46.66	54.21	34.17	470.73	1870.66	433.58	1229.16	0.51	7.04	2.52	3.45	44.77	146.77	2.44	22.44	5.37	6.36	2.20	17.17
FR	E	0.07	0.05	0.60	0.31	95.47	38.43	62.80	10.71	254.36	442.99	180.04	267.02	0.36	2.67	0.86	0.87	44.19	65.05	1.25	11.88	9.70	0.83	0.72	7.54
	A	0.08	0.03	0.35	0.04	178.80	21.20	59.30	5.90	6666.00	357.00	515.00	357.00	8.70	1.50	2.10	0.90	100.50	66.10	3.40	22.90				
	I	0.03	0.04	0.77	0.35	126.57	31.97	69.31	14.72	393.59	487.55	182.88	236.88	0.99	3.11	1.00	0.75	85.12	45.89	76.09	22.96	8.49	1.42	206.27	11.65
LAC	A	0.10	0.06	0.48	0.02	101.60	24.70	66.70	8.60	527.00	143.00	458.00	204.00	0.40	2.50	1.40	0.70	31.10	13.70	2.20	34.00				
TA	E	0.12	0.16	0.47	0.28	92.12	16.82	79.24	13.97	218.54	3046.23	170.21	808.96	0.22	3.22	1.11	3.13	55.15	140.49	3.08	17.05	5.52	7.50	0.69	10.10
MAI	E	0.16	0.07	0.43	0.16	153.78	37.93	97.14	6.05	-	1326.57	-	886.80	1.43	6.48	1.45	5.72		0.90	6.40	5.15	4.03	1.14	7.27	
SA	E	0.08	0.20	1.21	1.02	98.53	102.49	90.24	20.04	-	-	-	-	0.55	6.97	0.69	2.37		1.00	25.31	4.59	12.02	1.06	13.91	
JA	E	0.21	0.09	0.58	0.23	108.24	22.84	82.07	9.75	-	484.54	-	181.97	1.25	0.99	1.01	1.59		21.98	3.90	8.18	12.92	2.05	5.78	
JAF	E	0.78	0.03	0.28	0.09	86.02	31.37	70.55	7.96	-	779.89	-	312.19	4.06	4.07	35.36	2.89		18.59	1.87	17.28	9.21	7.76	6.28	

**Tab.1** Concentrazione dei metalli in traccia in *O. montagui* e *P. oceanica* spiaggiata (ppm). Loc, località di campionamento; Stag, stagione di campionamento; O.m., *O. montagui*; P.o., *P. oceanica*; PA, Patresi; MA, Magazzini; PG, Portoferraio-Grigolo; TO, Topinetti; MO, Mola-Porto Azzurro; FR, Cavo-Frugoso; LAC, Laconella, TA, Talamone; MAI, Maitiga; SA, Sabiratha; JA, Jamsur; JAF, Jamsur-Fish Factory; E, estate; A, autunno; I, inverno.



**Fig.4** Concentrazione dei metalli in traccia (ppm) in *O. montagui* in estate (barre bianche), autunno (barre a strisce) ed inverno (barre nere). PA, Patresi; MO, Mola-Porto Azzurro; MA, Magazzini; FR, Cavo-Frugoso; PG, Portoferraio-Grigolo; TO, Topinetti.



**Fig.5** Media del Fattore di bioaccumulo (BAF) per le località prese in esame in estate (barre bianche), autunno (barre a strisce) ed inverno (barre nere). Linea orizzontale, valore BAF=1. Nei grafici sono riportate anche le barre della deviazione standard per ogni elemento.

Confrontando le concentrazioni dei metalli nelle tre stagioni si può notare che sono concentrati maggiormente nelle orchestie raccolte in estate ( $p < 0.05$ , Binomial test).

Dai grafici riportati in Fig.4 si può inoltre notare, per alcuni metalli, una certa variabilità tra le concentrazioni registrate in *O. montagui* tra località. Le concentrazioni del Fe e del Pb negli animali di Frugoso e Topinetti sono molto elevate rispetto agli altri siti di campionamento, soprattutto in periodo autunnale ed estivo (Fe: Frugoso, autunno=6.666 ppm; Topinetti, estate=13.640 ppm, autunno=13.254 ppm. Pb: Frugoso, autunno=8.7 ppm; Topinetti, autunno=13.7 ppm). Nelle orchestie raccolte a Topinetti anche il Cr, in autunno (85 ppm), e il Nichel, in estate (25.2 ppm), presentano valori molto alti rispetto alle altre località, mentre la concentrazione invernale del Ni e del V negli anfipodi è particolarmente elevata a Frugoso (Ni: 76.09 ppm, V: 206.27 ppm) e Patresi (Ni: 21.17 ppm, V: 82.52 ppm).

La media del fattore di bioaccumulo (BAF) per le località prese in esame risulta  $< 1$  in estate per Mn e Pb, in autunno per Mn e Ni, in inverno per Mn, Pb, Ni e Cr (Fig.5). Hg, Cd, Zn, Cu, Fe, Al, As e V presentano un valore del BAF  $> 1$  in estate, autunno ed inverno, mentre As e V in entrambe le stagioni in cui è stato possibile analizzare la loro concentrazione negli animali e nella *Posidonia* spiaggiata (estate e inverno).

Si può notare che i valori del fattore di bioaccumulo per Hg e Ni sono sempre maggiori in estate rispetto alle altre due stagioni, mentre Fe, Cd, Cr e Zn mostrano i valori più elevati di BAF in autunno, invece V, ed in parte anche Al, in inverno.

#### 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente e nel precedente (Cap.2) lavoro permettono di affermare che *O. montagui* risulta un buon accumulatore di Hg, Cd, Zn, Cu, analogamente ad altre due specie di anfipodi, *T. saltator* e *Talorchestia ugalini* (Ugalini et al., 2005; Ungherese et al., 2010). Nonostante alcune differenze interspecifiche, probabilmente dovute a una diversa autoecologia, la capacità di bioaccumulo di *O. montagui* corrisponde in parte a quella di *T. saltator*, buon bioindicatore della contaminazione da metalli pesanti di coste sabbiose (per una revisione si veda Marsden e Rainbow, 2004), e di *T. ugalini*. Le tre specie sono, infatti, in grado di accumulare Hg, Cd, Zn e Cu, mentre per quanto riguarda il bioaccumulo degli altri metalli da parte di *O. montagui* i risultati non permettono una chiara interpretazione (Tab.2).

Nonostante le buone capacità di bioaccumulo di alcuni metalli in traccia, la concentrazione di questi nelle orchestie risulta influenzata dalla stagione.

Gli unici due metalli che mostrano una progressiva diminuzione nel fattore di bioaccumulo dall'estate all'inverno sono Hg e Cu. La concentrazione di entrambi i metalli negli anfipodi è più alta in estate e diminuisce in inverno.

	<i>T. saltator</i> *	<i>T. uolinii</i> **	<i>O. montagui</i>
<b>Hg</b>	+	+	+
<b>Cd</b>	+	+	+
<b>Zn</b>	+	+	+
<b>Cu</b>	+	+	+
<b>Fe</b>	+	-	?
<b>Al</b>	+	-	?
<b>Pb</b>	-	?	?
<b>Cr</b>	-	-	?
<b>Mn</b>	+	/	-
<b>Ni</b>	/	/	-
<b>As</b>	/	/	?
<b>V</b>	/	/	?

da: \*Ungherese et al., 2010

\*\*Ugolini et al., 2005

**Tab.2** Il segno + indica che il metallo è accumulato dagli animali (maggior concentrazione negli anfipodi rispetto a quella nella sabbia/*P. oceanica* spiaggiata e/o una correlazione statisticamente significativa tra le concentrazioni rilevate negli anfipodi e nel substrato). Il segno – indica che il metallo non è accumulato. Il segno ? indica la possibilità che il metallo venga accumulato dagli animali (correlazione vicino al limite di significatività o significativa solo in alcune stagioni; numero limitato di località di campionamento; alte concentrazioni negli animali solo in poche località).

E' da sottolineare che le alte concentrazioni estive di Hg rilevate negli animali e nella *P. oceanica* spiaggiata nella località libica di Jamsur Fish Factory (fino a dieci volte superiori rispetto alle altre località) hanno influito in modo significativo sul valore del fattore di bioaccumulo.

Risultato analogo è stato ottenuto per il Ni il quale in estate raggiunge un valore del BAF superiore all'unità, dovuto all'alta presenza di questo metallo negli animali in 3 località (Jamsur, Jamsur Fish Factory, Topinetti), anche se la concentrazione nello spiaggiato è maggiore in quasi tutte le località di campionamento durante tutte e tre le stagioni.

Cd, Zn e Cr vengono maggiormente accumulati in autunno e probabilmente anche il Fe per il quale sono state registrate concentrazioni altissime negli animali proprio in questo periodo, mentre i valori del BAF per Al e V sono più elevati in inverno.

Mn e Pb, invece, non sembrano essere accumulati, anche se in autunno il Piombo negli anfipodi raccolti in due località dell'isola d'Elba (Cavo-Frugoso e Topinetti) ha raggiunto concentrazioni molto elevate, tuttavia la concentrazione di tali metalli è quasi costantemente maggiore nello spiaggiato rispetto agli animali.

Casini e Depledge (1997) hanno studiato come la presenza di Fe, Cu e Zn potesse influire sull'accumulo del Cd in *P. platensis*, osservando che una miscela composta da più di due elementi non incideva sull'accumulo del cadmio, analogamente i risultati ottenuti nel presente lavoro non sembrano suggerire che la presenza simultanea di Fe, Zn, Cu e Cd nell'ambiente influisca sull'accumulo del Cd in *O. montagui*.

Il maggior accumulo in periodo autunnale ed invernale registrato per la alcuni metalli può essere dovuto al ciclo biologico di *O. montagui* in quanto questi anfipodi sono generalmente attivi da primavera fino a metà autunno ed è verosimile che in autunno gli Anfipodi presentino una concentrazione più elevata di alcuni contaminanti rispetto all'inizio dell'estate a causa del maggior tempo che hanno avuto a disposizione per poterli accumulare. Diversamente dai nostri risultati, Fialkowski e collaboratori (2003) avevano registrato una maggiore concentrazione di Cu all'inizio dell'estate piuttosto che in autunno in *T. saltator*, *D. deshayesii* e *O. cavimana*, e di Cd nelle prime due specie. Tale risultato, tuttavia, come suggerito anche dagli autori, può essere dovuto alla raccolta di animali di età molto diversa, tra i quali anche adulti che provengono dalla generazione nata l'anno precedente che ha superato l'inverno e che quindi è riuscita ad accumulare maggiori concentrazioni di questi elementi.

La diminuzione della concentrazione in *O. montagui* dei metalli durante l'inverno è associabile alla ridotta attività comune a molti anfipodi durante i mesi più freddi dell'anno, con un conseguente abbassamento del livello metabolico (Marsden e Rainbow, 2004). Inoltre, i risultati ottenuti nel presente lavoro circa la variazione stagionale della concentrazione di Cu nelle Orchestie, nelle quali si osserva una minor concentrazione corporea durante il periodo invernale è in linea con i precedenti studi di Rainbow e Moore (1990) e di Fialkowski e collaboratori (2003) effettuati su altre specie ed in diverse zone geografiche, lasciando pertanto supporre che la variazione stagionale dell'accumulo di questo elemento non dovuta alla disponibilità ambientale, ma sia legata al pigmento respiratorio presente nell'emolinfa di questi crostacei (Taylor e Spicer, 1986; Rainbow e Moore, 1990). Infatti, durante l'inverno gli anfipodi, in uno stato di ridotta attività metabolica, riducono la produzione dell'emocianina, la quale non porterebbe vantaggi in questa condizione fisiologica e ciò provoca una conseguente diminuzione della concentrazione di Cu nei loro corpi (White e Rainbow, 1985; Taylor e Spicer, 1986; Rainbow e Moore, 1990; Fialkowski et al., 2003).

Le località prese in esame sono, inoltre, soggette ad un diverso impatto antropico dovuto principalmente ad attività turistiche, portuali ed industriali, potenziali fonti di immissione di metalli nell'ambiente, il quale si riflette sull'accumulo dei metalli negli anfipodi, come si nota dalle alte concentrazioni di alcuni contaminanti rilevate a Portoferraio-Grigolo, Mola-Porto Azzurro e nelle località della costa libica. Inoltre, le peculiari caratteristiche geologiche dell'isola d'Elba, con alte concentrazioni di minerali ferrosi e la presenza di miniere estrattive, anche se attualmente non più attive, hanno portato ad alte



concentrazioni corporee di metalli in traccia nei campioni di *O. montagui* provenienti dalle località di Topinetti e Cavo-Frugoso, situate vicino alle miniere della zona di Rio Marina e Cavo.

La variabilità stagionale della concentrazione dei metalli in traccia accumulati da *O. montagui* sembra pertanto influenzata da fattori quali la disponibilità ambientale dei contaminanti e dal ciclo biologico degli animali. Questo conferma la necessità dell'impiego di bioindicatori che possano essere impiegati su vasta scala per un periodo di tempo sufficientemente lungo da poter controllare i processi che determinano i livelli di metalli nell'ambiente, siano essi continui o irregolari e puntiformi. *O. montagui*, possedendo tali caratteristiche oltre a buone capacità di accumulo, risulta un valido biomonitor della contaminazione da metalli in traccia nell'ambiente del sopralitorale.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Casini, S. & Depledge, M.H.** 1997. Influence of copper, zinc, and iron on cadmium accumulation in the talitrid amphipod, *Platorchestia platensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **59**, 500-506.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183-192.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Zmudzinski, L.** 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 81-93.
- Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Špegys, M. & Rainbow, P.S.** 2009. The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as biomonitor for trace metals bioavailability in European coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **58**, 39-44.
- Marsden, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in Crustaceans affect their ecology-the Amphipods example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.
- Moore, P.G. & Rainbow, P.S.** 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda. *Oecologia*, **73**, 120-126.
- Moore, P.G., Rainbow, P.S. & Hayes, E.** 1991. The beach-hopper *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor for copper and zinc: North Sea trials. *Science of the Total Environment*, **106**, 221-238.
- Phillips, D.J.H. & Rainbow, P.S.** 1994. *biomonitoring of trace aquatic contaminants*. 2<sup>nd</sup> Ed. Chapman & Hall, London.
- Rainbow, P.S.** 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, **31**, 183-192.
- Rainbow, P.S.** 1999. Bioaccumulation of trace metals: biological significance. *Oceanis*, **24**, 547-561.
- Rainbow, P.S. & Moore, P.G.** 1990. Seasonal variation in copper and zinc concentrations in three talitrid amphipods (Crustacea). *Hydrobiologia*, **196**, 65-72.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **28**, 567-582.
- Rainbow, P.S., Emson, R.H., Smith, B.D., Moore, P.G. & Mladenov, P.V.** 1993. Talitrid amphipods as biomonitors of trace metals near Dunedin, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **27**, 201-207.

- Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D.** 1998. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193-200.
- Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Smith, B.D., Best, S.L., Nassiri, Y. & Langston, W.J.** 1999. Trace metal uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in NW Europe differentially enriched with trace metals. *Marine Ecology Progress Series*, **183**, 189-203.
- Siegel, S. & Castellan Jr, J.N.** 1989. Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences, 2<sup>nd</sup> Ed. McGraw Hill, New York.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of the heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhoppers species: *Talitrus saltator* Montagu and *Talorchestia ugolinii* Bellan Santini and Ruffo. *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.
- Ugolini, A. & Ungherese, G.** 2011. Sandhoppers as bioindicators of anthropogenic influence on Mediterranean sandy beaches. In: *Life in the Mediterranean sea: a look at habitat changes*. (Ed. N. Stambler), Nova Science Publishers Inc., in press.
- Ungherese, G., Baroni, D., Focardi, S. & Ugolini, A.** 2010. Trace metal contamination of Tuscan and eastern Corsican coastal supralittoral zones: the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) as a biomonitor. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73(8)**, 1919-1924.
- Taylor, A.C. & Spicer, J.I.** 1986. Oxygen-transporting properties of the blood of two semi-terrestrial amphipods, *Orchestia gammarellus* (Pallas) and *O. mediterranea* (Costa). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **97**, 135-150.
- White, S.L. & Rainbow, P.S.** 1985. On the metabolic requirements for copper and zinc in molluscs and crustaceans. *Marine Environmental Research*, **16**, 215-229.
- Zar, J.H.** 1984. Biostatistical Analysis. 2<sup>nd</sup> ed Prentice-Hall, New Jersey.



# CAPITOLO 4

## ***Posidonia oceanica* (L.) Delile come bioindicatore della contaminazione litorale: confronto tra piante vive e spiaggiate**

---

I risultati presentati nel seguente capitolo sono stati ottenuti in collaborazione con il Dott. F. Rugi ed il Prof. R. Udisti (Dipartimento di Chimica, Università di Firenze), il Dott. G. Perra (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena) e il Prof. A. Ugolini.



## INTRODUZIONE

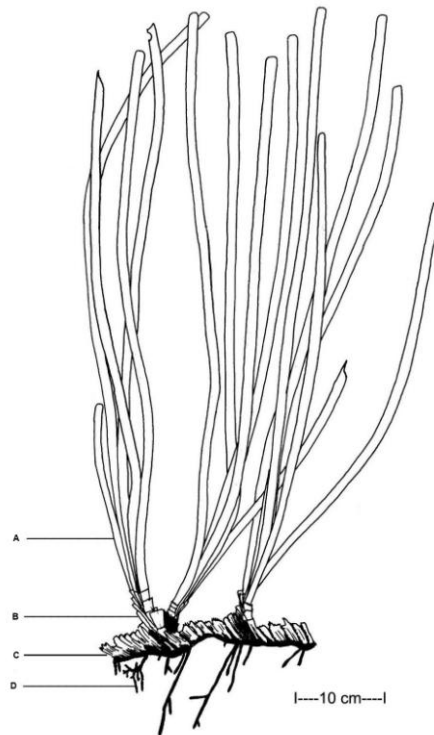
La *Posidonia oceanica* (L.) Delile è una fanerogama marina endemica del Mar Mediterraneo distribuita tra la superficie e i 40 metri, lungo il piano infralitorale prevalentemente a substrato incoerente, ma si può ritrovare anche su substrati rocciosi. Queste angiosperme possono colonizzare vaste aree del fondale marino fino a formare aggregati monospecifici ad alta densità denominati “praterie”. Le praterie a *Posidonia* ricoprono un’ampia area delle zone costiere occupando una superficie totale di circa 37.000 Km<sup>2</sup>, corrispondente al 1 – 2 % dell’intero bacino del Mar Mediterraneo (Pasqualini et al., 1998; Boudouresque et al., 2006).

Le fanerogame marine come *P. oceanica* svolgono un ruolo essenziale nella struttura e nel funzionamento degli ecosistemi costieri. Le piante marine e gli organismi associati al loro apparato fogliare sono considerati tra i maggior sistemi produttivi delle acque costiere, sostenendo varie reti trofiche basate sulla produzione primaria delle macrofite e delle alghe ad esse associate (Klumpp et al., 1989). Le estese praterie di macrofite rappresentano inoltre un substrato dinamico che incrementa largamente l’area disponibile per la colonizzazione di molti organismi, al cui interno trovano nutrimento e protezione, fornendo così un habitat unico per diverse specie animali e vegetali (Ott, 1980; Klumpp et al., 1989).

Le praterie di *Posidonia* costituiscono una ricchezza inestimabile per il Mar Mediterraneo, in quanto rappresentano un sito ad alta concentrazione di biomassa ed un ecosistema ad alta produttività paragonabile ai grandi complessi forestali della terraferma. Pertanto, *P. oceanica* può essere considerata come la specie più produttiva tra le macrofite marine contribuendo ad una frazione significativa della produzione primaria totale nella zona neritica (Ott, 1980; Pergent et al., 1994; Pergent-Martini et al., 1994).

In quanto pianta superiore, *P. oceanica* presenta una netta differenziazione in radici, fusto (modificato in rizoma) e foglie (Fig. 1). All’apice del rizoma si torva il “fascicolo fogliare” costituito da 5-8 foglie nastriformi che possono superare anche la lunghezza di un metro con una larghezza intorno ai 5-10 mm. Le foglie, dopo una vita tra i 5 e gli 11 mesi, si distaccano vengono sparse sui fondali contribuendo alla disponibilità di detrito per l’alimentazione di molti organismi viventi oppure vengono spiaggiate dando origine a depositi caratteristici, spesso di notevoli dimensioni, detti *banquettes* (Molinier e Picuard, 1953; Boudouresque et al., 2006).

Come altre specie di fanerogame marine, *P. oceanica* è molto sensibile ai cambiamenti delle condizioni e la sua ampia distribuzione geografica, insieme alla longevità ed alla facile reperibilità durante tutto l’arco dell’anno la rendono particolarmente adatta per studi di tipo ambientale. *P. oceanica* è inoltre un pianta che riesce ad assimilare sia dal sedimento che dal medium acquoso notevoli quantità di elementi chimici e composti xenobiotici, tutte



**Fig. 1** La fanerogama marina *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Organi della pianta: A, foglia; B, scaglia; C, rizoma; D, radice.

caratteristiche che la rendono un ottimo biomonitor per valutare il grado di contaminazione ambientale (Vighi e Bacci, 1998; Luoma e Rainbow, 2008).

*P. oceanica*, infatti, viene frequentemente impiegata come biomonitor delle acque costiere proprio grazie alla sua capacità di accumulare nei tessuti una grande varietà di contaminanti quali metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici, ed altri composti xenobiotici (Agostini et al., 1997; Pergent-Martini e Pergent, 2000; Lafabrie et al., 2007; Lewis et al., 2007), quantità che riflettono la concentrazione degli stessi nell'ambiente (Sanchiz et al., 2000; Campanella et al., 2001; Lafabrie et al., 2008).

L'assorbimento dei composti inquinanti da parte di *P. oceanica* può avvenire sia dalla colonna d'acqua, attraverso la superficie fogliare, che dal sedimento e dall'acqua interstiziale, mediante le radici. Per questo motivo, in numerosi studi è stato osservato che le concentrazioni di metalli in traccia nelle radici, nel rizoma e nelle foglie variavano in modo significativo tra le varie parti della pianta prese in esame (Schlacher-Hoenlinger e Schlacher, 1998; Capiomont et al., 2000; Lafabrie et al., 2008).



*P. oceanica*, inoltre, diversamente dalle altre fanerogame del Mediterraneo, possiede delle caratteristiche biologiche che possono rappresentare una sorta di memoria biologica del sistema. Le scaglie delle foglie, persistendo sul rizoma per tempi molto lunghi, costituiscono dei segnali cronologici validi per valutare la produzione della pianta su scale temporali anche abbastanza lunghe e la tecnica della lepidocronologia (come quella della dendrocronologia applicata alle piante terrestri) si avvale di tali segnali. Unendo la tecnica che permette di datare alcune parti di questa fanerogama (fino ad alcune decine di anni) con l'analisi dei metalli in traccia, è stato possibile individuare l'andamento temporale della contaminazione degli ambienti costieri (Ancora et al., 2004; Gosselin et al., 2006).

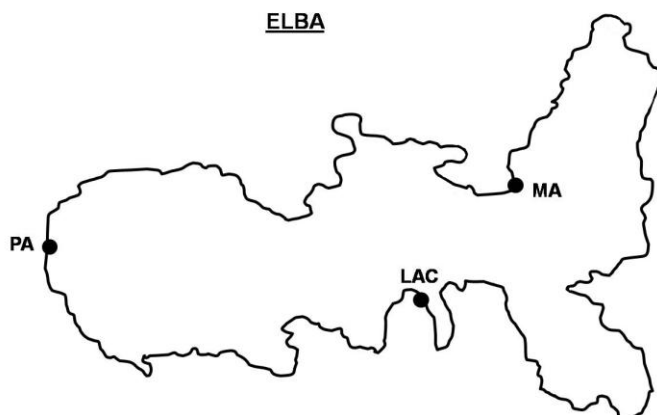
In numerose ricerche è stato inoltre valutata l'estensione dell'inquinamento da metalli in traccia rispetto al punto di origine della contaminazione. Per fare ciò sono state selezionate stazioni di campionamento che si trovassero progressivamente più lontane dalle fonti inquinanti quali aree portuali, scarichi urbani, centri industriali e cave minerarie. I risultati ottenuti in questi studi hanno mostrato una chiara relazione positiva tra la vicinanza all'origine della fonte di contaminazione e la concentrazione dei metalli presenti in *P. oceanica* che diminuivano progressivamente allontanandosi dalla sorgente inquinante (Lafabrie et al., 2009). Inoltre, la concentrazione degli inquinanti varia sensibilmente in zone soggette a diverso impatto antropico. Ad esempio, è stato notato come in località vicine a porti industriali l'inquinamento da Pb fosse molto alto, mentre vicino a miniere di asbesto le concentrazioni di Co, Cr e Ni nella pianta aumentassero notevolmente (Gosselin et al., 2006; Lafabrie et al., 2008).

L'importanza di *P. oceanica* come bioindicatore della contaminazione delle coste è stata determinata su varie parti delle piante viventi, mentre studi sul confronto tra parti vive e morte di questa fanerogama, fatta eccezione per quanto riguarda le scaglie (Pergent, 1998; Gosselin et al., 2006; Lafabrie et al., 2006), hanno ricevuto finora scarsa attenzione nonostante che il campionamento di parti spiaggiate di questa pianta sia certamente più semplice ed economico.

Le foglie di *P. oceanica*, le quali hanno un ciclo vitale di circa un anno, svolgono un ruolo essenziale nel ciclo dei metalli in traccia e dei contaminanti da loro accumulati, e sono probabilmente la fonte principale da cui i consumatori di questa pianta assumono tali inquinanti. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le relazioni tra le concentrazioni di metalli in traccia e idrocarburi policiclici aromatici in foglie vive e spiaggiate di *P. oceanica* in due diversi periodi dell'anno, per determinare se fosse possibile i) utilizzare le foglie presenti nelle banquettes come indicatori della contaminazione costiera e se ii) la variazione stagionale della concentrazione dei contaminanti nel medium acquoso si riflettesse in un andamento temporale anche nelle foglie spiaggiate.

## 2. MATERIALI E METODI

I campioni di foglie di *P. oceanica*, sia vive che spiaggiate, sono stati raccolti in 3 località dell'isola d'Elba: Magazzini, Patresi e Laconella (Fig 2); la scelta delle località era finalizzata a confrontare ambienti più inquinati con



**Fig 2** Località di campionamento: MA, Magazzini; PA, Patresi; LAC, Laconella

ambienti meno colpiti dall'attività antropica. Magazzini è situata nella baia di Portoferraio quindi direttamente colpita dal traffico portuale. Patresi, localizzata lungo la costa ovest dell'isola, si trova in una zona ancora relativamente poco impattata dall'attività umana. Laconella è situata in un'area a forte vocazione turistica della costa sud dell'isola.

I campioni di foglie vive, ottenuti tagliando a un'altezza di circa 20 cm dall'apice fogliare, sono stati raccolti tramite immersioni subacquee, a profondità comprese tra i 2 e i 10 metri, nei mesi di giugno e settembre del 2009. Nel mese di giugno a Magazzini sono state raccolte 6 repliche di campioni di foglie alla profondità di 3 metri e 5 repliche a 4 metri, mentre a settembre sono stati prelevati 6 campioni a 2 metri di profondità. Lungo la riva corrispondente al punto d'immersione è stato prelevato anche un campione di foglie spiaggiate di *P. oceanica*. Lo stesso procedimento è stato attuato a giugno a Patresi, con la raccolta sia di foglie spiaggiate che di foglie vive. In questa località i prelievi sono stati effettuati a tre profondità: 6 repliche a 4 e 7 metri di profondità e 4 repliche a 10 metri. Nel mese di Settembre sono stati, invece, raccolti 6 campioni ad ogni profondità. L'ultima raccolta è avvenuta a Laconella dove sono stati prelevati un campione di foglie spiaggiate e 2 repliche di foglie vive alla profondità di 2 metri.

I campioni raccolti sono stati trasportati in laboratorio, congelati e dopo essere sciacquati in acqua distillata e ripuliti dagli epifiti, sono stati disidratati

ad una temperatura di 25° C fino a raggiungere un peso secco costante. Circa 150 mg di ogni campione sono stati poi analizzati per determinare il contenuto di metalli in traccia e IPA.

### **2.1 Determinazione del contenuto di metalli in traccia**

Per ogni campione raccolto è stata analizzata la concentrazione dei seguenti metalli in traccia: Al, Fe, Zn, Cu, Cr, Hg, Pb, Cd, Mn, Ni, As e V. I campioni sono stati mineralizzati in contenitori di teflon contenenti 2 ml di HNO<sub>3</sub> e 0,5 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alla temperatura di 120° C, sotto pressione di 2000-3000KB per 8 ore.

Dopo la digestione, la soluzione è stata portata a volume di 10 ml aggiungendo acqua deionizzata. Durante ogni mineralizzazione sono state effettuate diverse “prove in bianco” introducendo nei contenitori di teflon solamente i reagenti, in modo da verificare l’assenza di contaminazioni.

Cd, Cr, Ni e Pb sono stati determinati tramite spettrometria ad assorbimento atomico in fornello di grafite (GF-AAS) mentre Al, Fe, Zn, Mn e Cu sono stati analizzati con lo spettrometro di emissione al plasma (ICP/EAS). Per determinare il contenuto di Hg è stata utilizzata la tecnica dei vapori freddi (FIMS, “Flow Injection Mercury System”). Infine, As e V sono stati determinati mediante l’utilizzo dell’ICP-AES Varian 720 attraverso il metodo dello standard interno.

La concentrazione degli elementi in traccia (espressa come µg/g peso secco) è stata calcolata con il metodo delle “addizioni interne”. La precisione, espressa come deviazione standard relativa derivante da 5 diverse digestioni dello stesso campione, era compresa in un intervallo del 5-10 %.

### **2.2 Determinazione del contenuto di IPA**

Le analisi sono state condotte secondo il metodo EPA 3545B (US EPA, 1996), una procedura per l’estrazione con Accelerated Solvent Extraction (ASE) di composti semivolatili. I campioni disidratati sono stati estratti con ASE con una miscela di esano (30%) in diclorometano (70%). L’estratto è stato poi evaporato sotto flusso di azoto e portato a volume finale (0,5 ml) con acetonitrile. La determinazione qualitativa e quantitativa dei 16 IPA, ritenuti “contaminanti prioritari” dall’Environmental Protection Agency (EPA), è avvenuta mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) con rivelatore a serie di fotodiodi (Waters® PDA 996) e rivelatore a fluorescenza (Waters® 474 Scanning Fluorescence Detector) in serie.

### **2.3 Analisi statistica**

Per indagare se nella località di Magazzini, a diverse profondità di campionamento, vi fossero differenze significative tra le concentrazioni dei metalli in traccia analizzati è stato usato il test di Mann-Whitney, mentre per quanto riguarda la località di Patresi sono state confrontate le concentrazioni

degli inquinanti rilevate a 3 diverse profondità utilizzando il test di Kruskal-Wallis. Per valutare l'esistenza di eventuali differenze tra le concentrazioni dei metalli accumulati nelle voglie vive nelle diverse località di campionamento è stato utilizzato il test di Mann-Whitney, per quanto riguarda le concentrazioni di IPA, mentre è stata adoperata un'analisi della varianza non parametrica (Kruskal-Wallis test) per tutti i quei metalli per i quali non era stata raggiunta la significatività statistica nel confronto tra profondità: Al, Fe, Zn, Cu, Cr, Hg, Pb e Cd.

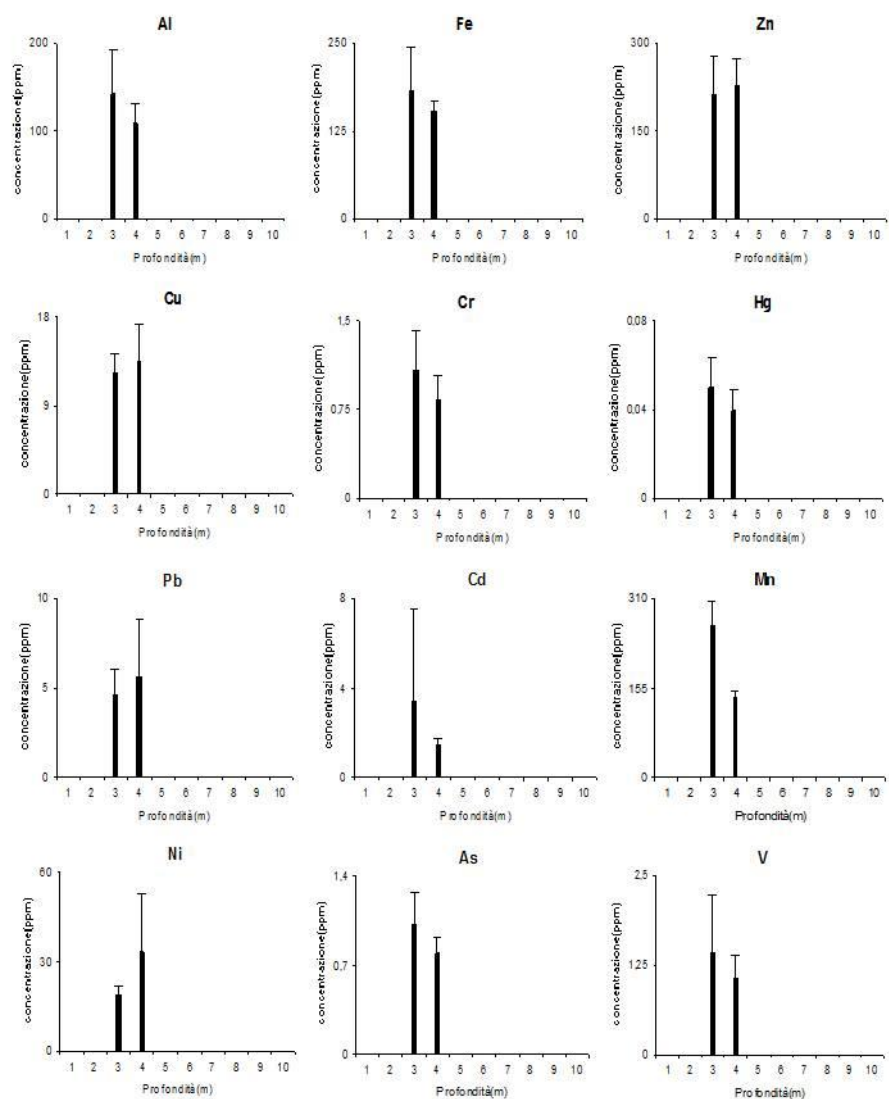
Nel confronto tra le concentrazioni dei metalli presenti nelle foglie vive e spiaggiate sono stati presi come valori, nel caso del vivo, la media delle concentrazioni dei metalli alle diverse profondità, e nel caso dello spiaggiato, la media delle concentrazioni di giugno 2008 e 2009 per Patresi e Magazzini, mentre di settembre 2008 e giugno 2009 per Laconella. Le relazioni tra le concentrazioni dei metalli nelle foglie vive e in quelle spiaggiate di *P. oceanica* sono state analizzate tramite il test del Chi-quadro  $\chi^2$  (Zar, 1984; Siegel e Castellan, 1989) escludendo quei metalli che avevano riportato differenze significative tra le profondità: Mn, Ni, As e V.

Per determinare se vi fossero differenze significative tra le concentrazioni dei metalli nelle foglie di *P. oceanica* spiaggiate di recente e quelle presenti sulla spiaggia da più tempo è stato utilizzato il Sign test.

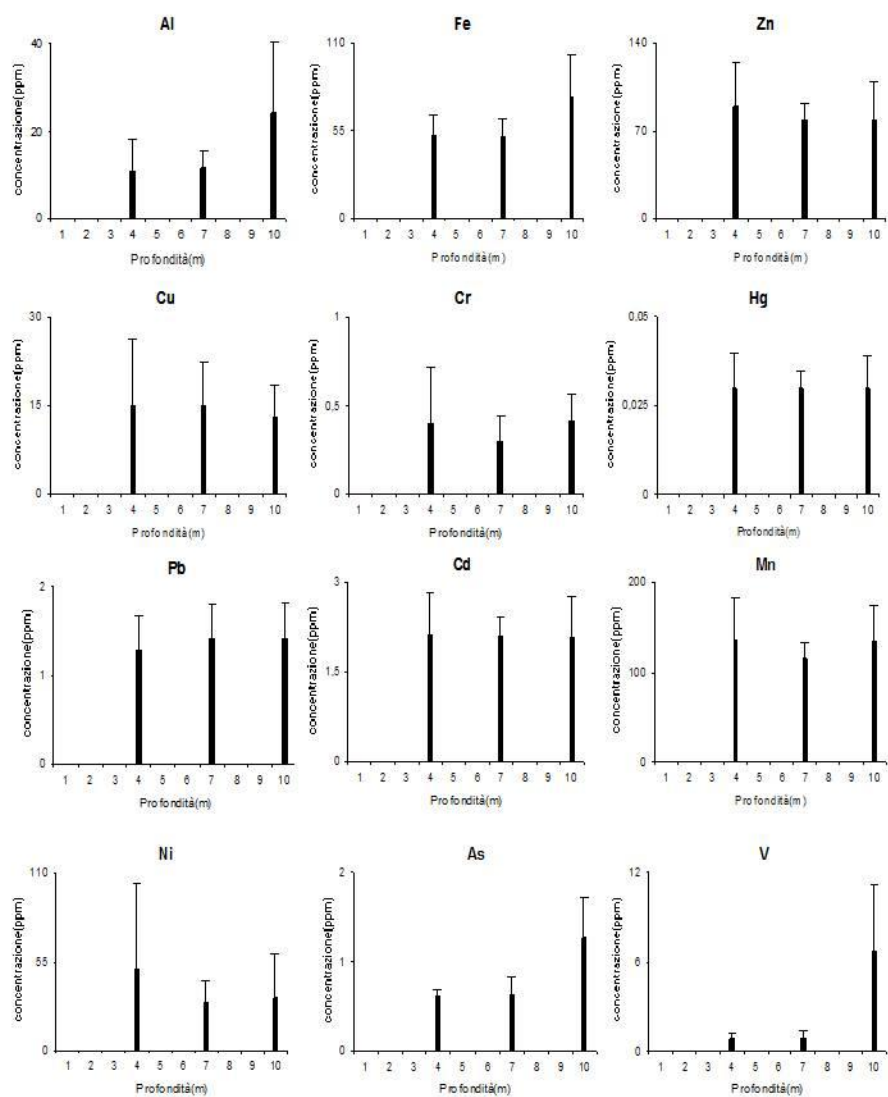
### 3 RISULTATI

#### 3.1 metalli in traccia

Il confronto, ottenuto dalle analisi delle concentrazioni dei metalli nella località di Magazzini alle profondità di 3 e 4 metri, ha evidenziato delle differenze significative solo nel caso del Mn e del Ni (Mn:  $U=0$ ,  $p<0.005$ ; Ni:  $U=3$ ,  $p<0.05$ . Mann-Whitney test). Per tutti gli altri metalli (Al, Fe, Zn, Cu, Cr, Hg, Pb, Cd, As; V) il confronto non raggiunge la significatività statistica (Fig 3). Confrontando i risultati ottenuti dalle analisi delle concentrazioni dei metalli in traccia alle profondità di 4 , 7 e 10 metri nella località di Patresi, non sono emerse differenze statisticamente significative nel caso dei seguenti metalli: Al, Fe, Zn, Cu, Cr, Hg, Pb, Cd, Mn, Ni. L'analisi della varianza ha rivelato che l'accumulo di As e V tra le tre profondità considerate varia in modo significativo (As:  $H=7.132$ ,  $p<0.005$ ; V:  $H=8.485$ ,  $p<0.05$ . Kruskal-Wallis test) (Fig 4). Nella tabella 1 sono riportati i valori delle medie delle concentrazioni di tutti i campioni raccolti alle varie profondità nelle tre località e le rispettive deviazioni standard di ciascun metallo.



**Fig 3** Concentrazione media dei metalli in traccia (ppm), con relative deviazioni standard, in *P. oceanica* raccolta nella località di Magazzini alle profondità di 3 e 4 metri.



**Fig 4** Concentrazione media dei metalli in traccia (ppm), con relative deviazioni standard, in *P. oceanica* raccolta nella località di Patresi alle profondità di 4, 7 e 10 metri.

Località	Al	Fe	Zn	Cu	Cr	Hg	Pb	Cd	Mn	Ni	As	V
<b>Ma 3</b>	141,72 (51,84)	183,12 (59,54)	212,56 (63,75)	12,31 (1,92)	1,08 (0,33)	0,05 (0,01)	4,63 (1,38)	3,40 (4,15)	263,95 (41,40)	19,08 (2,95)	1,01 (0,26)	1,43 (0,79)
<b>Ma 4</b>	108,34 (22,82)	152,46 (15,37)	226,89 (45,95)	13,56 (3,64)	0,84 (0,19)	0,04 (0,008)	5,67 (3,17)	1,48 (0,23)	138,09 (11,37)	33,44 (19,41)	0,79 (0,13)	1,08 (0,30)
<b>Pa 4</b>	10,94 (7,28)	51,81 (13,58)	90 (34,81)	15,01 (11,17)	0,40 (0,32)	0,03 (0,009)	1,29 (0,38)	2,12 (0,70)	136,19 (46,17)	49,79 (52,92)	0,62 (0,06)	0,83 (0,43)
<b>Pa 7</b>	11,62 (3,69)	51,42 (11,39)	78,71 (13,02)	15 (7,17)	0,30 (0,14)	0,03 (0,005)	1,42 (0,39)	2,11 (0,31)	115,27 (17,27)	29,95 (12,73)	0,64 (0,19)	0,81 (0,59)
<b>Pa 10</b>	24,25 (16,19)	76,72 (25,42)	78,97 (30,82)	13,08 (5,33)	0,41 (0,15)	0,03 (0,009)	1,42 (0,40)	2,07 (0,69)	134,05 (39,94)	32,42 (27,54)	1,27 (0,44)	6,71 (4,47)
<b>Lac 2</b>	302,74 (308,54)	224,50 (201,03)	84,78 (26,10)	13,87 (11,89)	1,08 (0,80)	0,03 (0)	1,23 (0,53)	1,68 (0,01)	87,34 (11,49)	40,38 (45,51)	1,57 (1,58)	1,39 (0,98)

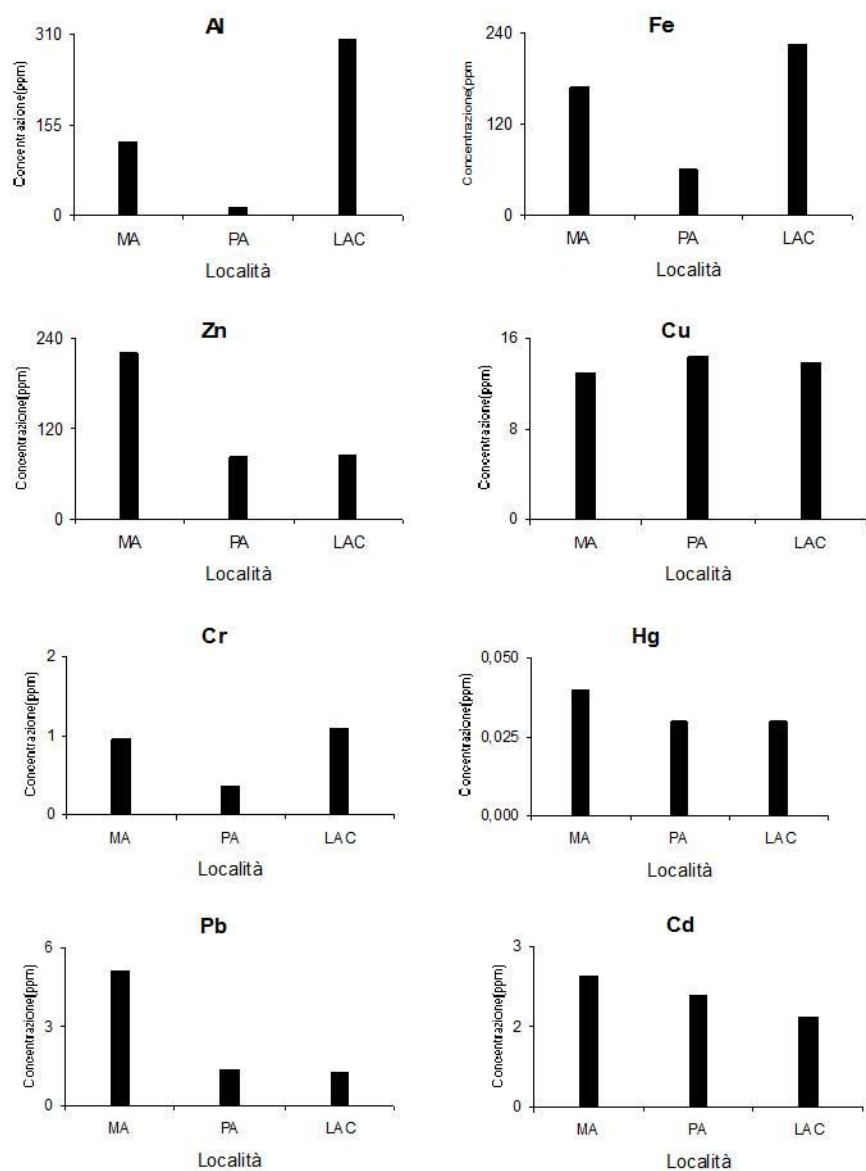
**Tab 1** Concentrazioni medie e relative deviazioni standard (in parentesi) dei metalli in traccia in *P. oceanica* nelle varie località (Ma, Magazzini; Pa, Patresi; Lac, Laconella) e profondità di raccolta (2, 3, 4, 7 e 10 metri).

L'analisi della varianza non parametrica delle concentrazioni dei metalli nelle tre località considerate risulta significativa nel caso dei seguenti metalli: Al, Fe, Zn, Cr, Pb e Hg (Al:  $H=20.832$ ,  $p<0.001$ ; Fe:  $H=20.407$ ,  $p<0.001$ ; Zn:  $H=19.868$ ,  $p<0.001$ ; Cr:  $H=16.377$ ,  $p<0.001$ ; Hg:  $H=10.031$ ,  $p<0.01$ ; Pb:  $H=19.924$ ,  $p<0.001$ , Kruskal-Wallis test). Per gli altri metalli, Cu e Cd, non sono state rilevate differenze statisticamente significative (Fig 5).

Il confronto tra le concentrazioni dei metalli accumulati nelle foglie vive e in quelle spiaggiate non ha raggiunto, per nessun metallo, la significatività statistica, sia considerando le tre località separatamente che complessivamente ( $\chi^2$  test) (Fig 6).

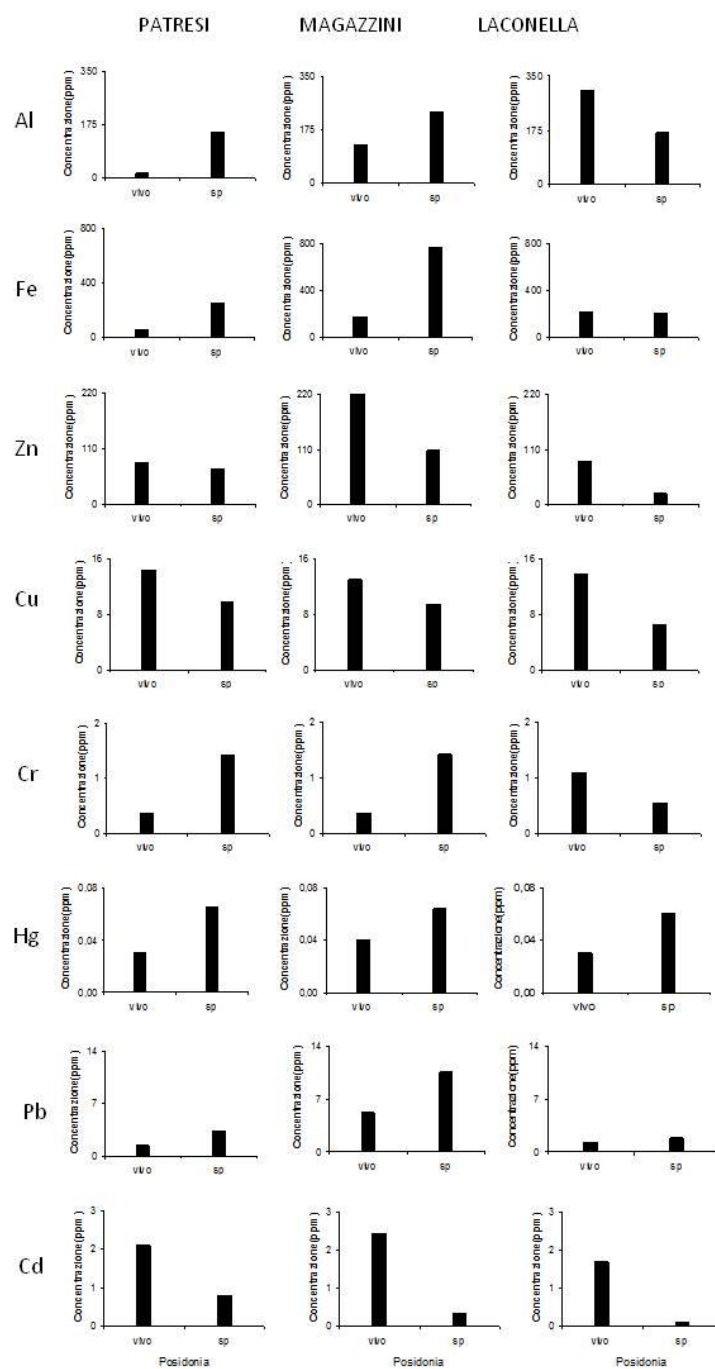
In Fig. 7 sono riportate le concentrazioni, alle diverse profondità, nelle foglie vive e spiaggiate dei metalli che avevano rivelato differenze significative a Magazzini (Mn e Ni) e a Patresi (As e V).

L'andamento delle concentrazioni dei metalli in traccia accumulati in piante vive e spiaggiate di *P. oceanica* non risulta essere costante al variare delle località (Fig.6 e 7). Un trend omogeneo per i tre punti di campionamento è emerso nel caso di Zn, Cu, Cd, Mn e Ni, maggiormente presenti nelle foglie vive, mentre Hg, Pb e V risultano maggiormente concentrati nel materiale spiaggato. Al, Fe, e Cr risultano in concentrazione maggiore nelle foglie spiaggiate raccolte a Magazzini e Patresi, mentre in quelle vive a Laconella. Infine, As appare maggiormente concentrato nello spiaggato a Magazzini, nel vivo a Laconella e a Patresi alla profondità di 10 metri.

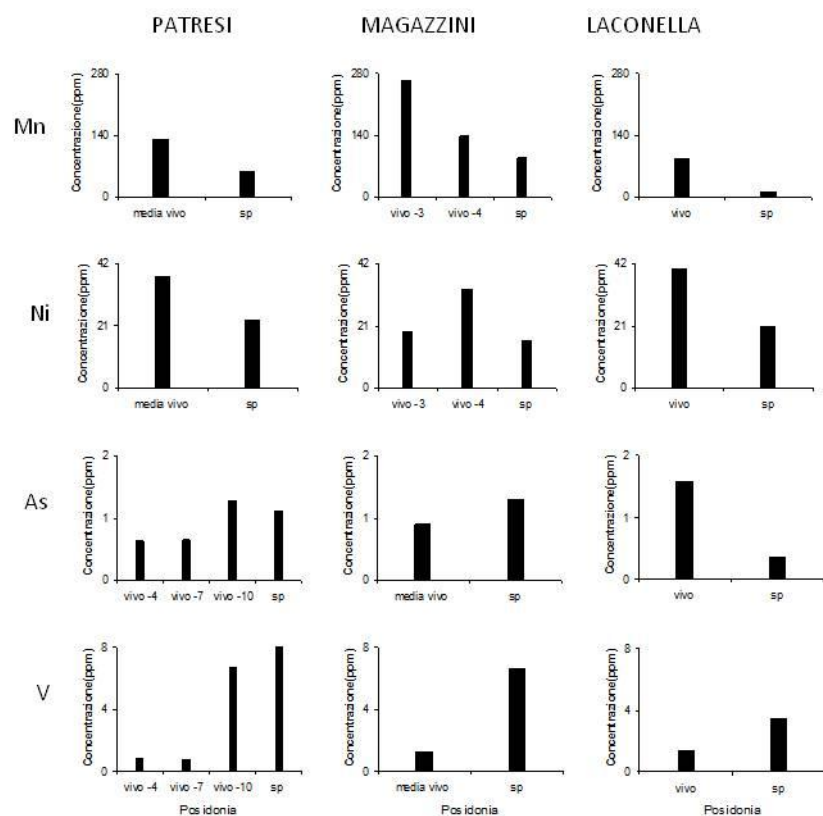


**Fig. 5** Concentrazioni medie dei metalli accumulati nelle foglie vive di *P. oceanica* nelle tre località di campionamento. MA, Magazzini; PA, PAtresi; LAC, Laconella.





**Fig. 6** Concentrazioni medie, espresse in ppm, dei metalli accumulati nelle foglie vive (vivo) e spiaggiate (sp) di *P. oceanica* nelle tre localit  di raccolta.



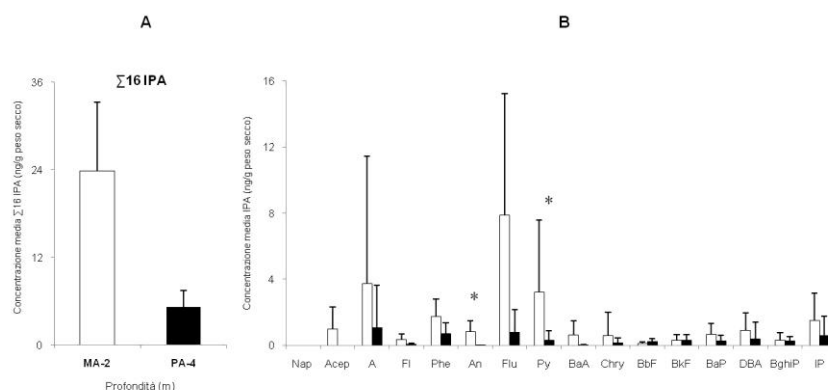
**Fig. 7** Concentrazioni medie, espresse in ppm, di Mn, Ni, As e V accumulati nelle foglie vive (vivo, media vivo) e spiaggiate (sp) di *P. oceanica* nelle tre località di raccolta. Sono state specificate alcune profondità di campionamento per Magazzini (Mn, Ni) e Patresi (As, V) per quanto riguarda i campioni di foglie vive (-3, -4, -7, -10 metri). Per Laconella è stato riportato il valore della concentrazione dei metalli nei campioni raccolti a 2 metri di profondità.

Nella località di Laconella sono state confrontate le concentrazioni dei metalli accumulati nelle foglie spiaggiate facendo una distinzione tra lo spiaggato recente e quello più vecchio (Fig. 8). Tutti i metalli risultano maggiormente concentrati nelle foglie spiaggiate da più tempo ( $n=12$ ,  $\chi=0$ ,  $p<0.003$ . Sign test).

### 3.2 IPA

Le analisi del contenuto di IPA nelle foglie vive di *P. oceanica* hanno mostrato una netta differenza di concentrazione nei campioni di giugno rispetto a quelli di settembre (Tab.2). Nella località di Magazzini, infatti, le foglie raccolte a 3 metri di profondità non sembrano aver accumulato nessuno dei 16 IPA, mentre a settembre 15 dei 16 IPA esaminati sono stati rilevati nei campioni esaminati. Per quanto riguarda la medesima località, alla profondità di 4 metri è stato possibile raccogliere i campioni solo nel mese estivo e le analisi hanno mostrato che, diversamente dal campione raccolto alla profondità inferiore nello stesso mese, *P. oceanica* concentra nel suo apparato fogliare 6 dei 16 IPA.

Il contenuto di idrocarburi policicli aromatici presente nei campioni prelevati a Patresi nel mese di giugno a 4, 7 e 10 metri di profondità è risultato pressoché sempre inferiore al limite di rilevabilità, mentre la *Posidonia* raccolta a fine estate conteneva concentrazioni di IPA: a 4 metri di profondità sono stati rilevati 13 composti, 7 composti a 7 metri e 11 IPA alla massima profondità di campionamento (Tab.2). Considerando, nella località di Patresi (settembre), la concentrazione in *P. oceanica* di ogni IPA preso singolarmente, non sono emerse variazioni significative tra le tre profondità di raccolta, ad eccezione del Benzo(b)Fluorantene (BbF) ( $H = 9.525$ ,  $p = 0.008$ ; Kruskal-Wallis test). Questa differenza, tuttavia, è da ritenersi dovuta al fatto che alle profondità di 7 e 10 metri la concentrazione di BbF è risultata sotto al limite di rilevabilità in tutte le repliche effettuate. Analogamente, il confronto del contenuto totale di idrocarburi aromatici ( $\Sigma 16\text{IPA}$ ) nelle tre profondità di campionamento, sempre nel mese di settembre, non ha mostrato differenze statisticamente significative ( $H = 4.61$ ,  $p = \text{NS}$ ; Kruskal-Wallis test).



**Fig.8** Concentrazione media di IPA a Magazzini (barre bianche) e Patresi (barre nere) nel mese di settembre alle profondità di 2 e 4 metri, rispettivamente. A, Concentrazione totale; B, Concentrazione dei singoli IPA. In figura sono riportate anche le barre della deviazione standard. Gli asterischi indicano i composti (An e Py) in cui sono emerse differenze significative nella concentrazione tra le due località.

Confrontando la concentrazione degli IPA, sia singolarmente che come  $\Sigma 16\text{IPA}$ , nelle foglie raccolte a fine estate a Magazzini e Patresi alla minima profondità di campionamento, sono emerse differenze significative nell'accumulo di Acenafte (An) e Pirene (Py), ed anche nel contenuto totale degli idrocarburi esaminati (An:  $U = 0$ ,  $p = 0.002$ ; Py:  $U = 6$ ,  $p = 0.04$ ;  $\Sigma 16\text{IPA}$ :  $U = 1$ ,  $p = 0.006$ ; Mann-Whitney test) (Fig.8A e B). Inoltre, la differenza della concentrazione media di Fluorantene (Flu) nelle due località è risultata vicina alla significatività statistica ( $U = 6$ ,  $p = 0.052$ ; Mann-Whitney test).

I campioni estivi di foglie spiaggiate non hanno mostrato tracce di IPA nella località di Magazzini, mentre a Patresi sono stati rilevati Fenantrene (Phe) e Crisene (Chry). Le foglie spiaggiate raccolte a Laconella mostrano, invece, concentrazioni di 5 e 6 IPA, rispettivamente nel materiale spiaggato da tempo e di origine più recente (Tab. 3).

#### 4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti confermano che la fanerogama marina *P. oceanica* sia un buon bioindicatore della contaminazione da metalli in traccia nelle aree costiere (Schlacher-Hoenlinger e Schlacher, 1998; Pergent-Martini e Pergent, 2000; Campanella et al., 2001; Lafabrie et al., 2007), mentre la capacità di concentrare nel suo apparato fogliare composti organici come gli idrocarburi policiclici aromatici appare abbastanza limitata.

L'elevata concentrazione del Ferro rilevata nei campioni è, molto probabilmente, dovuta al profilo geologico dell'isola che l'ha resa uno dei luoghi più sfruttati per l'estrazione mineraria. Dai risultati spicca inoltre una maggiore concentrazione del Pb nella località di Magazzini rispetto alle altre due stazioni di campionamento prese in esame. La causa è attribuibile alla posizione geografica di tale località, in quanto situata nella baia di Portoferraio dove è presente il maggiore porto dell'isola e di conseguenza il traffico navale ha presumibilmente reso l'area altamente inquinata da questo metallo pesante (Lafabrie et al., 2007). Oltre al Pb anche lo Zn si trova in concentrazioni maggiori nelle zone portuali (Campanella et al., 2001) ed i risultati ottenuti confermano questo dato, in quanto anche in questo caso a Magazzini è stata rilevata la maggiore concentrazione di tale elemento rispetto alle altre due località. Un andamento simile è stato rilevato anche per il contenuto totale degli IPA, con una più alta concentrazione registrata nella baia di Portoferraio, in accordo con altri studi nei quali si rileva proprio nelle zone portuali, maggiormente soggette ad impatto antropico, un'alta concentrazione di questi composti organici (Adami et al., 2000; Muniz et al., 2004).

La località di Patresi, situata in una zona poco colpita dall'attività antropica rispetto a Magazzini e Laconella, situata in un'area ad alta vocazione turistica, ha mostrato valori generalmente meno elevati di tutti metalli in traccia ad eccezione di Cu e Cd, le cui concentrazioni non mostravano variazioni

Concentrazione media di IPA in foglie vive di *P. oceanica* (ng/g peso secco)

Località	Mese	Nap	Acep	A	Fl	Phe	An	Flu	Py	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	IP	Σ16IPA
MA-3	giugno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	settembre	-	0,98	3,75	0,36	1,75	0,85	7,90	3,20	0,63	0,60	0,10	0,30	0,65	0,92	0,32	1,50	23,80
MA-4	giugno	-	-	-	-	0,16	0,03	0,17	0,28	-	-	0,01	-	-	-	-	0,24	0,76
PA-4	giugno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	settembre	-	-	1,05	0,06	0,72	0,01	0,81	0,30	-	0,14	0,23	0,31	0,26	0,41	0,28	0,60	5,18
PA-7	giugno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	settembre	-	-	-	-	0,56	-	0,14	-	-	0,03	-	0,013	0,16	0,35	0,35	-	1,6
PA-10	giugno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	0,01
	settembre	0,74	-	0,59	0,05	1,29	0,01	0,21	-	-	0,04	-	0,04	0,09	1,19	0,58	-	5,04
LAC-2	giugno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LOD		0,25	0,25	0,5	0,05	0,02	0,01	0,03	0,05	0,03	0,03	0,01	0,01	0,03	0,1	0,04	0,03	

**Tab.2:** Concentrazione media dei 16 IPA in *P. oceanica* (ng/g peso secco) raccolta a Magazzini (MA), Patresi (PA) e Laconella (LAC) a varie profondità (2, 3, 4, 7 e 10 metri) a inizio e fine estate (giugno e settembre, rispettivamente). LOD, limite di rilevabilità dello strumento per i singoli IPA. I valori inferiori al limite di rilevabilità non sono stati inseriti.

Concentrazione di IPA in foglie spiaggiate di *P. oceanica* (ng/g peso secco)

Località	Mese	Nap	Acep	A	Fl	Phe	An	Flu	Py	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	IP	Σ16IPA
MA	giugno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA	giugno	-	-	-	-	0,55	-	-	-	-	0,58	-	-	-	-	-	-	1,13
LAC1	giugno	-	-	2,36	-	0,21	0,61	-	-	2,08	-	0,22	-	-	-	-	-	5,48
LAC2	giugno	-	-	-	-	2,44	1,4	1,18	0,08	1,04	-	-	-	-	-	-	0,59	6,73
LOD		0,25	0,25	0,5	0,05	0,02	0,01	0,03	0,05	0,03	0,03	0,01	0,01	0,03	0,1	0,04	0,03	

**Tab.3:** Concentrazione dei 16 IPA nelle foglie spiaggiate di *P. oceanica* (ng/g peso secco). MA, Magazzini; PA, Patresi; LAC1, Laconella, foglie spiaggiate presenti sulla battigia da tempo; LAC2, Laconella, foglie spiaggiate recentemente. Per ulteriori spiegazioni si veda Tab. 2.

significative tra i siti di campionamento, verosimilmente perché il primo è un metallo essenziale per la crescita ed il metabolismo della pianta che è, di conseguenza, in grado di regolarne la concentrazione nei tessuti (Gosselin et al., 2006), mentre la presenza del Cd probabilmente non è legata ad attività di origine antropica, ma a sorgenti naturali. Il Cr, invece, varia in modo significativo con valori di concentrazione decrescenti Laconella > Magazzini > Patresi; la presenza di questo metallo è tuttavia spesso correlata, oltre alla presenza di miniere di amianto, all'aumento dell'attività urbana ed industriale (Lafabrie et al., 2008).

La concentrazione di IPA nelle foglie spiaggiate mostra un andamento crescente Magazzini > Patresi > Laconella, con la particolarità che proprio nella zona portuale non fossero presenti tracce di IPA nel materiale spiaggato. Questo risultato è probabilmente dovuto al fatto che le foglie della fanerogama spiaggata raccolte a Magazzini possano provenire da praterie di *Posidonia* presenti in zone meno inquinate e che siano arrivate nella baia di Portoferraio tramite correnti marine. I campioni di foglie spiaggiate mostrano, inoltre, una concentrazione di IPA maggiore rispetto ai campioni di materiale vivo raccolto nello stesso periodo nelle medesime località, come avviene anche per metalli quali Hg, Pb e V, a differenza di Zn, Cu, Cd, Mn e Ni accumulati maggiormente nelle foglie vive.

Gli unici dati presenti in letteratura riguardanti il diverso assorbimento di metalli pesanti in parti morte di *P. oceanica*, rispetto alle parti vive, si riferiscono all'accumulo in scaglie morte (Gosselin et al., 2006). Tuttavia, queste strutture non possono essere considerate completamente senza vita in quanto, una volta staccata la foglia, rimangono attaccate ai rizomi e, se pur in maniera limitata, continuano ad avere degli scambi con il resto della pianta. Nelle scaglie è stata rilevata una concentrazione maggiore di Cr e Pb e inferiore di Ni, Cd e Zn rispetto alle foglie, questo perché, dopo il distacco fogliare, l'attivazione di fattori fisiologici fanno espellere Ni, Cd e Zn e assorbire Cr e Pb (Gosselin et al., 2006). Nonostante un confronto stretto tra questi risultati e quelli ottenuti dalle analisi delle concentrazioni dei metalli nelle foglie spiaggiate non sia completamente corretto, non si può trascurare il dato che vede proprio il Pb più concentrato nelle foglie spiaggiate mentre Zn, Cd e Ni in quelle vive.

Attraverso analisi lepidocronologiche nelle quali venivano confrontate le concentrazioni di Hg nelle scaglie morte e nelle foglie vive, nelle prime il metallo appariva maggiormente concentrato in quanto, dopo il distacco della foglia, le scaglie subiscono una diminuzione della biomassa che rende il Mercurio presente più concentrato (Pergent-Martini, 1998; Lafabrie et al., 2006, 2007). Le analisi effettuate su campioni di *P. oceanica* hanno fornito risultati analoghi, avendo rilevato una maggiore concentrazione di Hg nelle foglie spiaggiate rispetto a quelle vive.

In ultima analisi, è interessante notare come dal confronto delle concentrazioni dei metalli in traccia nel materiale spiaggato di origine recente e

nelle foglie spiaggiate da più tempo sia emerso che tutti i metalli siano nettamente più concentrati nello spiaggato più vecchio. Tale risultato potrebbe dipendere dal fatto le foglie spiaggiate da più tempo corrispondono alle foglie più vecchie e che quindi hanno assorbito una maggior quantità di metalli, o che tale fenomeno sia dovuto ad un assorbimento di tipo passivo.

*P. oceanica* si conferma pertanto un ottimo bioindicatore della contaminazione da metalli in traccia, mentre per quanto riguarda la capacità di accumulo di IPA i risultati, se pur preliminari, ottenuti nel presente lavoro necessitano un maggior approfondimento. Un ulteriore aspetto, attualmente scarsamente affrontato, su cui si dovrebbe cercare di far luce è la differenza di accumulo di metalli in traccia tra le parti vive e le parti morte di questa fanerogama, in quanto sono emersi risultati molto dissimili a seconda del metallo e della località di campionamento.

## 5 BIBLIOGRAFIA

- Adami, G., Barbieri, P., Piselli, S., Predonzani, S. & Reisenhofer, E. 2000. Detecting and characterising sources of persistent organic pollutants (PAHs and PCB) in surface sediments of an industrialized area (harbor of Trieste, northern Adriatic Sea). *Journal of Environmental Monitoring*, **2**, 261-265.
- Ancora, S., Bianchi, N., Butini, A., Buia, M.C., Gambi, M.C. & Leonzio, C. 2004. *Posidonia oceanica* as a biomonitor of trace elements in the Gulf of Naples: temporal trends by lepidochronology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23** (5), 1093-1099.
- Agostini, S., Desjobert, J.-M. & Pergent, G. 1997. Distribution of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Phytochemistry*, **48**, 611-617.
- Boudouresque, C.F., Bernard, G., Bonhomme, P., Charbonnel, E., Diviacco, G., Meinesz, A., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Ruitton, S. & Tunesi, L. 2006. *Préservation et conservation des herbiers à Posidonia oceanica*. Ramoge pub., Marseille (France).
- Campanella, L., Conti, M.E., Cubadda, F. & Sucapane, C. 2001. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. *Environmental Pollution*, **111**, 117-126.
- Capiomont, A., Piazzzi, L. & Pergent, G. 2000. Seasonal variations of total mercury in foliar tissue of *Posidonia oceanica*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **80**, 1119-1123.
- Gosselin, M., Bouqueneau, J.-M., Lefèvre, F., Lepoint, G., Pergent, G., Pergent-Martini, C. & Gobert, S. 2006. Trace metal concentrations in *Posidonia oceanica* of North Corsica (northwestern Mediterranean Sea): use as a biological monitor? *BMC Ecology*, **6**(12), 1-19.
- Klumpp, D.W., Howard, R.K. & Pollard, D.A. 1989. Trophodynamics and nutritional ecology of seagrass communities. In: *Biology of seagrasses* (Larkum, A.W.D., McComb, A.J. & Shepherd, S.A. Eds). pp. 394-457, Elsevier, Amsterdam.
- Lafabrie, C., Pergent, G. & Pergent-Martini, C. 2006. Memorization of mercury by the seagrass *Posidonia oceanica*. *Biologia Marina Mediterranea*, **13**, 48-50.
- Lafabrie, C., Pergent, G., Kantin, R., Pergent-Martini, C. & Gonzalez, J.-L. 2007. Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species – Validation of the use *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere*, **68**, 2033-2039.
- Lafabrie, C., Pergent-Martini, C. & Pergent, G. 2008. Metal contamination of *Posidonia oceanica* meadows along the Corsican coastline (Mediterranean). *Environmental Pollution*, **151**, 262-268.



- Lafabrie, C., Pergent, G. & Pergent-Martini, C.** 2009. Utilization of the seagrass *Posidonia oceanica* to evaluate the spatial dispersion of metal contamination. *Science of the Total Environment*, **407**(7), 2440-2446.
- Lewis, M.A., Dantin, D.D., Chancy, C.A., Abel, K.C. & Lewis C.G.** 2007. Florida seagrass habitat evaluation: A comparative survey for chemical quality. *Environmental Pollution*, **146**, 206-218.
- Luoma, S.N. & Rainbow, P.S.** 2008. *Metal contamination in aquatic environments: science and later management*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Molinier, R. & Picard, J.** 1953. Notes biologiques à propos d'un voyage d'études sur les côtes de Sicile. *Annales de l'Institut Océanographique*, **28**(4), 163-187.
- Muniz, P., Danulat, E., Yannicelli, B., García-Alonso, J., Medina, G. & Bicego, M.C.** 2004. Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediment of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environmental International*, **29**, 1019-1028.
- Ott, J.A.** 1980. Growth and production in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Marine Ecology*, **1**, 47-64.
- Pasqualini, V., Pergent-Martini, C., Clabaut, P. & Pergent, G.** 1998. Mapping of *Posidonia oceanica* using aerial photographs and side-scan sonar: application of the islands of Corsica (France). *Estuarine Coastal Shelf Science*, **47**, 359-367.
- Pergent-Martini, C.** 1998. *Posidonia oceanica* a biological indicator of past and present mercury contamination in the Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*, **45**, 101-111.
- Pergent-Martini, C. & Pergent, G.** 2000. Marine phanerogams as a tool in the evaluation of marine trace-metal contamination: an example from the Mediterranean. *International Journal of Environment and Pollution*, **13**, 1-6.
- Pergent-Martini, C., Rico-Raimondino, V. & Pergent, G.** 1994. Primary production of *Posidonia oceanica* in the Mediterranean Basin. *Marine Biology*, **120**, 9-15.
- Pergent, G., Romero, J., Pergent-Martini, C., Mateo, M.A. & Boudouresque, C.F.** 1994. Primary production, stocks and fluxes in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, **106**, 139-146.
- Sanchiz, C, García-Carrascosa, A.M. & Pastor, A.** 2000. Heavy metal contents in soft-bottom marine macrophytes and sediments along the Mediterranean Coast of Spain. *Marine Ecology*, **21** (1), 1-16.
- Schlacher-Hoenlinger, M.A. & Schlacher, T.A.** 1998. Accumulation, contamination, and seasonal variability of trace metals in the coastal zone – patterns in seagrass meadow from the Mediterranean. *Marine Biology*, **131**, 401-410.

- Siegel, S. & Castellan Jr., J.N.** 1989. Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences, 2<sup>nd</sup> ed. McGraw Hill, New York.
- Vighi, M. & Bacci, E.** 1998. *Ecotossicologia. Trattato di tossicologia e terapia*. UTET, Torino.
- Zar, J.H.** 1984. Biostatistical Analysis. 2<sup>nd</sup> ed Prentice-Hall, New Jersey.

# CAPITOLO 5

## **Relationship between heavy metals pollution and genetic diversity in Mediterranean populations of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda)**

---

I dati presentati in questo capitolo sono stati oggetto di pubblicazione:  
G. Ungherese, A. Mengoni, S. Somigli, D. Baroni, S. Focardi, A. Ugolini, 2010, “**Relationship between heavy metals pollution and genetic diversity in Mediterranean populations of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda)**”, Environmental Pollution, Vol. 158, 1638-1643.



## ABSTRACT

Trace metals are one of the groups of pollutants that reduce genetic variability in natural populations, causing the phenomenon known as “genetic erosion”. In this study we evaluate the relationship between trace metals contamination (Hg, Cd and Cu) and genetic variability, assessed using fluorescent Inter-Simple Sequence Repeats (fISSR). We used eight populations of a well-established biomonitor of trace metals on sandy beaches: the amphipod *Talitrus saltator*. The trace metals analysis confirmed the ability of sandhoppers to accumulate Hg, Cd and Cu. Moreover, populations from sites with high Hg availability had the lowest values of genetic diversity. Our results validate the use of fISSR markers in genetic studies in sandhoppers and support the “genetic erosion” hypothesis by showing the negative influence of Hg contamination on sandhopper genetic diversity. Therefore, genetic variability assessed with fISSR markers could be successfully employed as a biomarker of Hg exposure.

**Keywords:** amphipods, trace metals, genetic variability, bioaccumulation, Inter-Simple Sequence Repeats

## 1. INTRODUCTION

The genetic composition of natural populations is constantly modified by natural events (mutations, natural selection, stochastic processes and migrations). The evaluation of genetic diversity is especially important for species inhabiting transitional ecosystems, such as the supralittoral band of sandy shores, subjected to periodic and aperiodic changes in biotic and abiotic stress factors. Anthropogenic impact, such as pollution, can cause severe perturbations of the genetic structure. Understanding the effect of pollutants on genetic variability is fundamental in preserving the evolutionary potential of natural populations. Among the various groups of contaminants present in coastal areas, heavy metals seem to strongly affect genetic variability, both directly (via germ cell mutations) and indirectly (via somatic mutations or ecological and physiological effects) (Bickham et al., 2000; Belfiore and Anderson, 2001; De Wolf et al., 2004). By favoring more tolerant genotypes and causing demographic bottlenecks, trace metals exposure can alter the genetic composition of a population, leading to a decrease of genetic variability known as “genetic erosion” (Van Straalen and Timmermans, 2002).

Talitrid amphipods, one of the main components (in terms of biomass) of the supralittoral of sandy beaches, play an important role in the energy flow within the sandy beach ecosystem because they feed on organic matter of marine and terrestrial origin and provide nourishment for many species of beetles, fishes, birds and mammals (e.g. see Griffiths et al., 1983). The sandhopper *Talitrus saltator* is a well-established biomonitor of trace metals contamination, since studies carried out on the Baltic coast of Poland (Rainbow et al., 1998; Fialkowski et al., 2000, 2009), on the U.K. coast (Moore and Rainbow, 1987; Rainbow et al., 1989; Moore et al., 1991) and on Mediterranean shores (Ugolini et al., 2004, 2005, 2008) have demonstrated that *T. saltator* accumulates trace metals (mainly Cu, Cd, Hg, Zn, Mn, Al, Fe and Ni).

Despite the importance of the species, little is known about the genetic structure of *T. saltator* populations, especially at the micro-geographical scale where cycles of extinction and colonization may be frequent and detailed knowledge of population diversity and structure could be crucial for risk assessment of beach ecosystems. Previous studies have reported data on large-scale geographical variation in the whole Mediterranean basin (De Matthaeis et al., 1995, 1998, 2000; Scapini et al., 1999). They showed a high level of genetic variation and a pattern of genetic differentiation between populations fitting the isolation by distance model (De Matthaeis et al., 2000). However, it is unclear how the described patterns are applicable on a small geographical scale, i.e. how predictable is it that populations of *T. saltator* living in close proximity will exchange alleles.

To date, no molecular markers have been developed for analyses of *T. saltator* population genetics. Due to the low variability, the use of allozyme patterns has little use when high-resolution studies, such as those performed at

the micro-geographical scale, have to be performed. Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) are molecular markers with high resolving power at the population level which do not need prior molecular knowledge of the organisms (e.g. genome sequence, microsatellites, etc.); they also allow a large number of samples to be analyzed thanks to the possibility of automation by the use of fluorescently labeled primers and capillary electrophoresis in an automated sequencer (fISSR, Nagaraju et al., 2002). ISSR markers have been widely used in plants for germplasm characterization and population genetics studies (see for instance Semagn et al., 2006; He et al., 2007), and their use is now extending to animal population studies (e.g. Wink, 2006; Pazza et al., 2007; Machkour-M'Rabet et al., 2009) and taxon and cell line identification (e.g. Maltagliati et al., 2006; Tan et al., 2006).

In this study we evaluated the effects of three accumulated trace metals with high toxicity and harm for biological systems and human health (Hg, Cu and Cd) on the genetic variability of Mediterranean populations of *T. saltator*, assessed using fluorescent ISSR markers. Since previous research has shown that genetic variability in *T. saltator* seems to vary according to shoreline stability (Ketmaier et al., 2003; Scapini et al., 2005), we also took this factor into account.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Collection of samples**

Eight populations of *T. saltator* were collected in June 2008 along the Tyrrhenian coast of central Italy (Fig. 1), from 10°16'31''E latitude to 11°11'41''E latitude, at sites with different degrees of trace metals contamination (Ugolini et al., 2004) and coastal stability (Albani et al., 1940; Ferretti et al., 2003; Rossi et al., 2008) (Tab. 1). Adult individuals (except for ovigerous female) were collected, transported alive to the laboratory and stored frozen at -80°C prior to DNA extraction and trace metals analysis. Since size can influence the amount of accumulated metals (Marsden and Rainbow, 2004) in amphipods, only individuals of similar weight (0.015 - 0.02 g) were used for Hg, Cd and Cu analysis. At each sampling site, a sample of sand was collected in the zone frequented by the sandhoppers during the day and analyzed for trace metals contamination.

### **2.2. DNA extraction and fluorescent ISSR amplification**

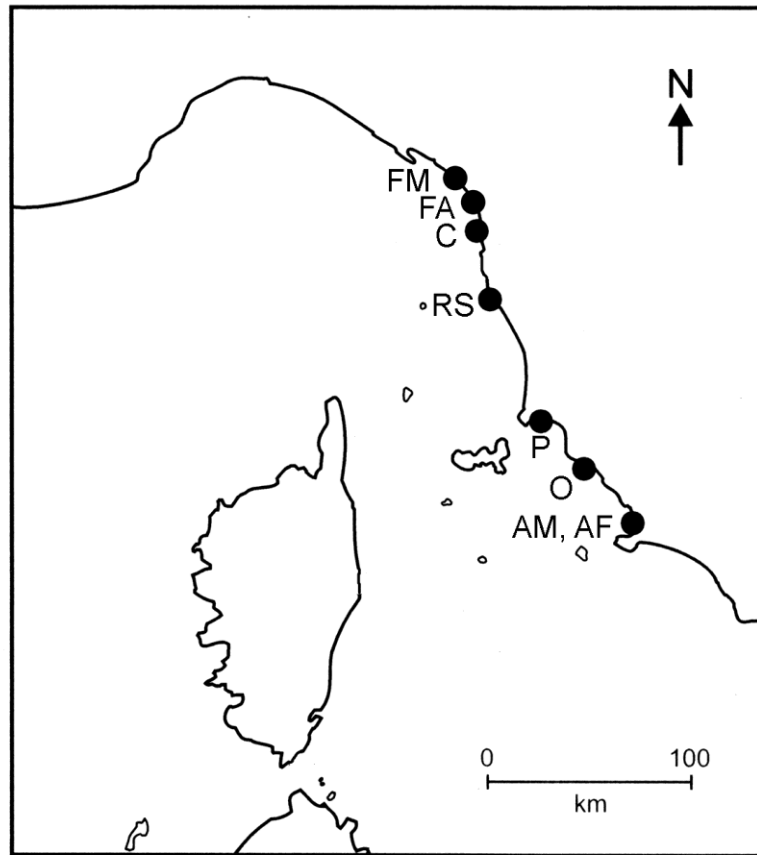
DNA was extracted from animals stored at -80°C using a NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Single animals were washed in physiological solution to eliminate sand and residual material from the legs, ground in sterile 1.5 ml polypropylene tubes with sterile Teflon pestles and then subjected to DNA extraction according to the kit manufacturer's instructions.

**Table 1.** Main features and genetic diversity of the analyzed populations. Population name, code, number of animals analyzed and geographical coordinates are shown. See text for further explanations.

Population	Code	No. of animals	Longit.	Latit.	Coastal stability
Morto Vecchio	FM	16	43°44'55'	10°16'31''	stable
Arno river	FA	18	43°40'55'	10°16'52''	unstable
Calambrone	C	18	43°34'56'	10°17'56''	unstable
Rosignano Solvay	RS	14	43°22'24'	10°26'23''	unstable
Piombino	P	17	42°57'07'	10°34'11''	stable
Ombrone river	O	16	42°39'30'	11°00'50''	unstable
Albegna beach	AM	10	42°30'36'	11°11'30''	unstable
Albegna river	AF	14	42°30'16'	11°11'41''	stable

DNA was quantified by spectrophotometric readings (Biophotometer, Eppendorf) and gel electrophoresis after ethidium bromide staining. ISSR amplification was carried out in a total volume of 25  $\mu$ L containing 10 ng of template DNA, 2 U of *Taq* DNA polymerase (GoTaq, Promega), 10 pmols of fluorescently labeled ISSR primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM  $MgCl_2$  and 1X concentration of *Taq* DNA polymerase buffer (GoTaq, Promega). Cycling conditions were as follows: 5 min 95°C, followed by 40 cycles composed of 20 sec 95°C, 30 sec 66°C-1°C/cycle for the first 10 cycles and then 55°C, 2 min 72°C and a final extension step of 5 min 72°C. Amplification products from all 130 animals were resolved by capillary electrophoresis on an Applied Biosystems ABI PRISM® 3100 Automated Capillary Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using GenScan ROX 2500 (Applied Biosystems) as size standard. Fifteen animals from different populations were amplified twice to establish the reproducibility and background noise cut-off.





**Fig. 1.** Map of the Tyrrhenian coast of central Italy showing the sites where populations were collected.

## 2.2 Trace metals analysis

The samples of sand and sandhoppers were dehydrated at 40°C until constant weight (minimum 0.5 g dry weight) and then finely ground. Around 150 mg of each sample were mineralized in Teflon vessels containing 3 ml of HNO<sub>3</sub> at 120°C for 8 hours. After digestion, the solution was brought to a volume of 10 ml by addition of deionized water. During each mineralization, several “blank trials” were performed to verify the absence of contamination.

The analyses of metal contents were performed by atomic absorption spectrometry. Cd and Cu were determined by atomization with a graphite furnace and Zeeman background corrector, while the FIMS (Flow Injection Mercury System) was used for Hg. Each analysis was carried out three times and the accuracy of the analytical procedures was assessed by comparing the results of contemporary digestions and analyses of Standard Reference Materials (SRMs): SRM 1566 “oyster tissue” from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA). The results of the determinations were only accepted if the values measured for the SRMs were within the certified concentration range. The element concentrations (expressed as µg/g) were calculated by the method of “internal additions”. The coefficients of variation for the elements analyzed were between 5% and 10%.

## 2.3 Data analysis

The bioaccumulation of each metal in *T. saltator* was investigated by comparing the sand and sandhopper concentrations by means of the Sign test (Siegel and Castellan, 1989).

For the ISSR data, chromatogram files from automated sequencer sizing were imported into GeneMarker ver. 1.71 software (SoftGenetics LLC, State College, PA, USA) by filtering with the default options of the module for AFLP analysis. The cut-off values (200 fluorescence units for background noise and size range from 100 to 2000 nt) were set after analysis of replicate samples, taking into account only bands present in duplicate reactions from 15 test animals. Consequently, only peaks with the above-mentioned characteristics were considered for profile analysis of the whole dataset of 130 animals. Statistical analyses were performed on a binary matrix produced by linearly combining the results of different primers, assigning 1/0 values to band presence/absence. A matrix of genetic similarity between animals was computed with NTSYS-pc ver. 2.02 (Rohlf, 1990) based on presence/absence of bands, using Jaccard’s coefficient of similarity. Unlike Lynch and Milligan’s parameters for dominant markers (Lynch and Milligan, 1994), Jaccard’s coefficient takes into account only band presence sharing between individuals and is commonly used for the analysis of markers treated as dominant, such as ISSRs (Lowe et al., 2004).

Within-population genetic variation was computed as “mean number of pairwise differences” and “average gene diversity over loci” using Arlequin

3.11 software (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>). Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) as implemented in Arlequin 3.11 was used to analyze the partition of total genetic variation at three hierarchical levels: within populations, between populations and between groups of populations. The statistical significance was computed by a permutation test after 10 000 random permutations. The Bayesian clustering method for dominant markers, implemented by a Markov chain Monte Carlo algorithm present in Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2007), was also used to identify the population structure. Data were obtained with runs of 100 000 iterations (three times for each K-value) and a burning of 20 000 iterations.

Genetic distances between populations were estimated by computing a matrix of pairwise  $F_{ST}$  values (Slatkin, 1995) which was then used to infer a Neighbor-Joining dendrogram with MEGA4 software (Tamura et al., 2007). The significance of pairwise  $F_{ST}$  values was computed by a permutation test after 1000 random permutations.

Pairwise  $F_{ST}$  values were compared with the linear and log-transformed geographical distances between populations according to Mantel's test (Mantel, 1967) as implemented in NTSYS-pc ver. 2.02 (Rohlf, 1990); normalized Mantel Z statistics were calculated after 1000 permutations.

The Spearman rank-order correlation coefficient test (Siegel and Castellan, 1989) was used to establish if there were relationships between trace metals pollution and genetic variability and between stability of the coastal environment and genetic variability.

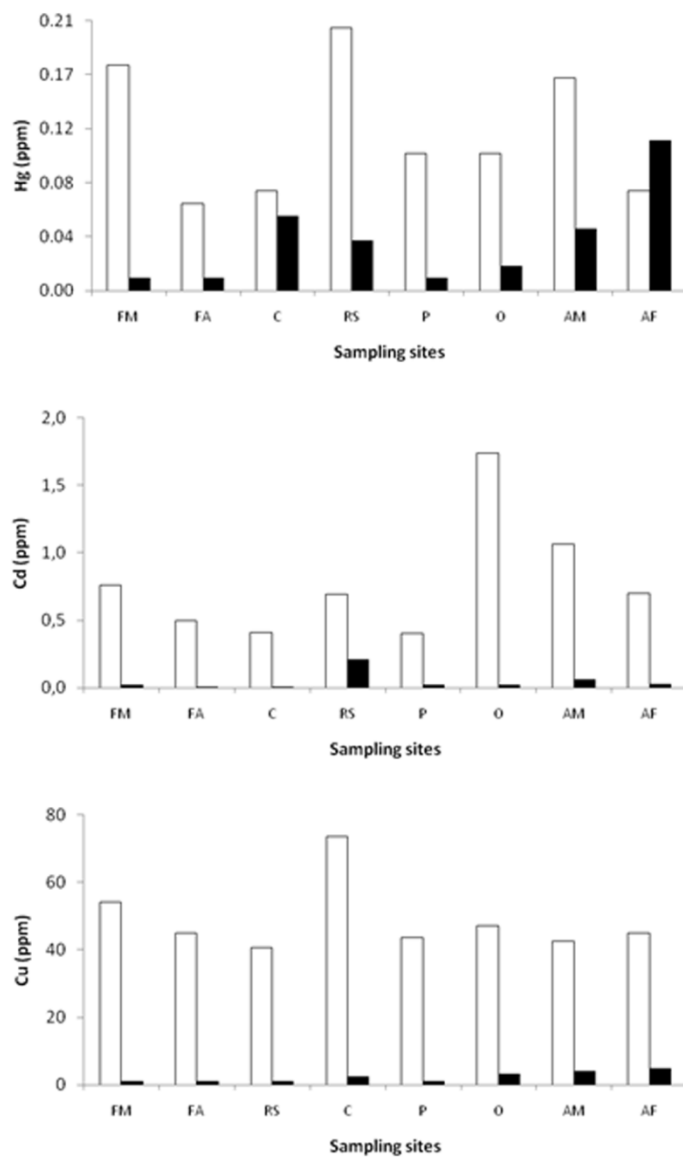
### 3. RESULTS

#### 3.1 Trace metals accumulation

Figure 2 and table 2 shows that the concentrations of Hg, Cd and Cu in amphipod tissues were generally higher than those in the sand ( $n = 8$ ,  $x = 1$ ,  $p = 0.035$  for Hg,  $n = 8$ ,  $x = 0$ ,  $p = 0.004$  for Cu and Cd).

#### 3.2 ISSR fingerprinting

Ten primers [ISSR#1: HVH(TTC)<sub>4</sub>; ISSR#2: YG(CA)<sub>9</sub>; ISSR#3: (CA)<sub>7</sub>; ISSR#4: (CA)<sub>7</sub>RY; ISSR#5: RY(CA)<sub>7</sub>; ISSR#6: V(CT)<sub>8</sub>D; ISSR#7: B(GA)<sub>5</sub>H; ISSR#8: (TGA)<sub>5</sub>; ISSR#9: YG(GA)<sub>9</sub>; ISSR#10: YG(CT)<sub>9</sub>] were initially screened for the presence of amplification products, reproducibility, readability and pattern polymorphism in DNA of two animals from different populations. Two of the primers (ISSR#5 and ISSR#9) gave the most successful results and were used for the analysis of all samples. These two primers produced 54 polymorphic bands (markers) ranging from 242 to 1014 bp for ISSR#9 (46 markers) and from 369 to 581 bp for ISSR#5 (8 markers). In total, 504 bands were retrieved in 130 animals. Each animal showed an average of  $3.77 \pm 1.16$  markers.



**Fig. 2.** Trace metals concentrations (ppm) in the sand (black bars) and in the sandhoppers (white bars). For each element, sampling sites are ordered according to the increase of metal concentration in the sand. For further explanations, see Fig. 1 and Tab. 1.

**Table 2.** Genetic diversity of analyzed populations, estimated as “average gene diversity over loci” and “mean number of pairwise differences”; Npm: number of private markers. Hg, Cd and Cu concentration in sandhoppers is also shown. For further explanations, see Table 1 and text.

Population code	Genetic diversity		Npm	Metals concentration (ppm)		
	Mean number of pairwise differences	Average gene diversity over loci		Hg	Cd	Cu
<b>FM</b>	4.30	0.0796	0	0.18	0.76	54.2
<b>FA</b>	5.75	0.1065	1	0.07	0.50	44.9
<b>C</b>	5.41	0.1000	2	0.08	0.41	73.6
<b>RS</b>	4.83	0.089	0	0.21	0.69	40.6
<b>P</b>	6.11	0.1132	2	0.11	0.40	43.7
<b>O</b>	5.40	0.1001	0	0.11	1.74	47.2
<b>AM</b>	4.33	0.0802	0	0.17	0.70	42.4
<b>AF</b>	6.89	0.1275	2	0.08	1.06	45.0

### 3.4 Genetic diversity

The variation of within-population genetic diversity was quite high (Table 2), ranging from 4.30 (mean number of pairwise differences) of population FM to 6.89 of population AF. Only two markers were present in all populations (public alleles), 40 were distributed in 2-6 populations, while 12 were restricted to one population only (private alleles). The distribution of private markers among populations is also reported in Table 2.

Four populations did not show private alleles (AM, FM, O, RS), while the others showed one or two private alleles.

### 3.5 Hierarchical structure of genetic variation

AMOVA (Table 3) showed that the genetic differentiation among populations was relatively high ( $F_{ST} = 0.165$ ). The greatest proportion of the total variation in our sample (83.45 %) was due to intra-population differences, rather than to among-population differences (16.55 %). The geographical differentiation of populations was also tested. The partition of populations into five and six groups gave the highest among-group variance components (also with significant P values). Moreover, the Bayesian inference of population structure performed with Structure 2.2 gave similar results, with maximal Ln-likelihood at K=5 (-1191.4).

**Table 3.** Analysis of molecular variance (AMOVA) in 123 individuals from eight *T. saltator* populations: a) overall; b) and c) geographical partition with different groupings <sup>a</sup>

#### a) Overall

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance	% Total	P
Among populations	7	76.749	0.53848	16.55	<0.0001
Within populations	115	312.357	2.71615	83.45	<0.0001
Total	122	389.106	3.25463		

#### b) Five groups partition

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance	% Total	P
Among groups	4	63.693	0.51342	15.39	<0.008
Among populations / Groups	3	13.056	0.10604	3.18	<0.0001
Within populations	115	312.357	2.71615	81.43	<0.0001
Total	122	389.106	3.33560		

c) Six groups partition

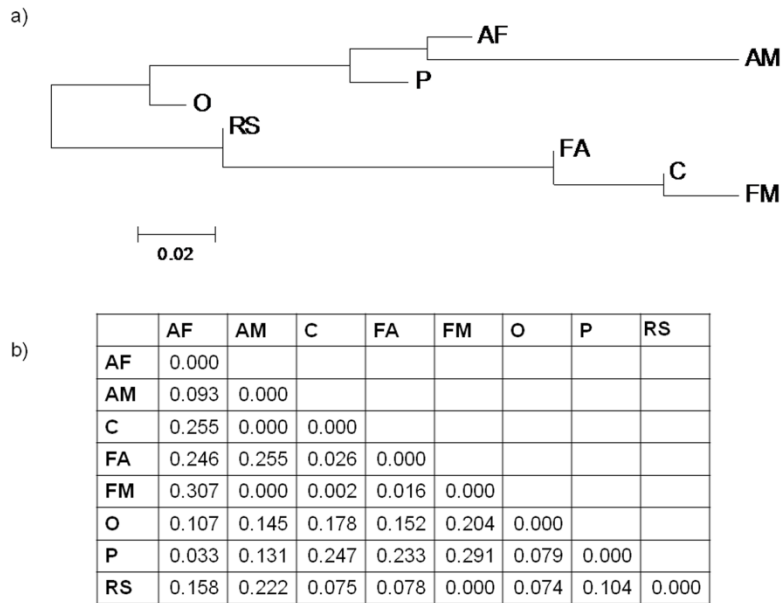
Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance	% Total	P
Among groups	5	70.157	0.58480	17.54	<0.02
Among populations / Groups	2	6.592	0.03350	1.00	<0.0001
Within populations	115	312.357	2.71615	81.46	<0.0001
Total	122	389.106	3.33445		

<sup>a</sup> The AMOVA was performed attributing the following two types of geographical groupings: b) north-south gradient with five groups (FM, FA, C); ( RS); (P), (O); (AM, AF); c) north-south gradient with six groups (FM, FA, C); ( RS); (P), ( O); (AM); ( AF). For each grouping, the percentage of total variance observed was attributed to two or three hierarchical partitions: among groups; among populations within groups; among single individuals within populations. Data show the degrees of freedom (d.f.), the sum of squared deviation, the variance component estimate, the percentage of total variance contributed by each component and the probability of obtaining a more extreme component estimate by chance alone (P). P-values were estimated by computing 10,000 permutations.

### 3.6 Genetic differentiation between populations

The Neighbor-Joining dendrogram of populations based on pairwise  $F_{ST}$  (Figure 3a) showed a well-structured pattern of genetic distances. Two main clusters could be recognized within the *T. saltator* group: populations P, AM, AF and populations O, RS, FA, C, FM, corresponding to the southern and northern groups of localities indicated in Figure 1. This subdivision was statistically well supported and accounted for 15.1% of the variation (as computed with AMOVA,  $P < 0.04$ ). Within the cluster corresponding to the northern populations, the most similar ones (C, FM and FA) formed a tight sub-cluster. Since there was no statistical support for the pairwise  $F_{ST}$  values between them (Figure 3b), it can be assumed that these three populations form a unique group with no differentiation among them. In contrast, there are significant pairwise  $F_{ST}$  values between all three populations (P, AM, AF) in the southern cluster, supporting their genetic differentiation.

To test for a geographically-based distribution of genetic diversity, we carried out Mantel's test of correlation between genetic and geographical distances. The results indicated a high level of correlation with both linear ( $r = 0.805$ ;  $p < 0.005$ ) and log-transformed ( $r = 0.640$ ;  $p < 0.007$ ) geographical distances.



**Fig. 3.** Genetic differentiation between populations. a) Neighbor-joining dendrogram; b) pairwise  $F_{ST}$  (values in bold indicate non-significant values at  $P < 0.05$ )

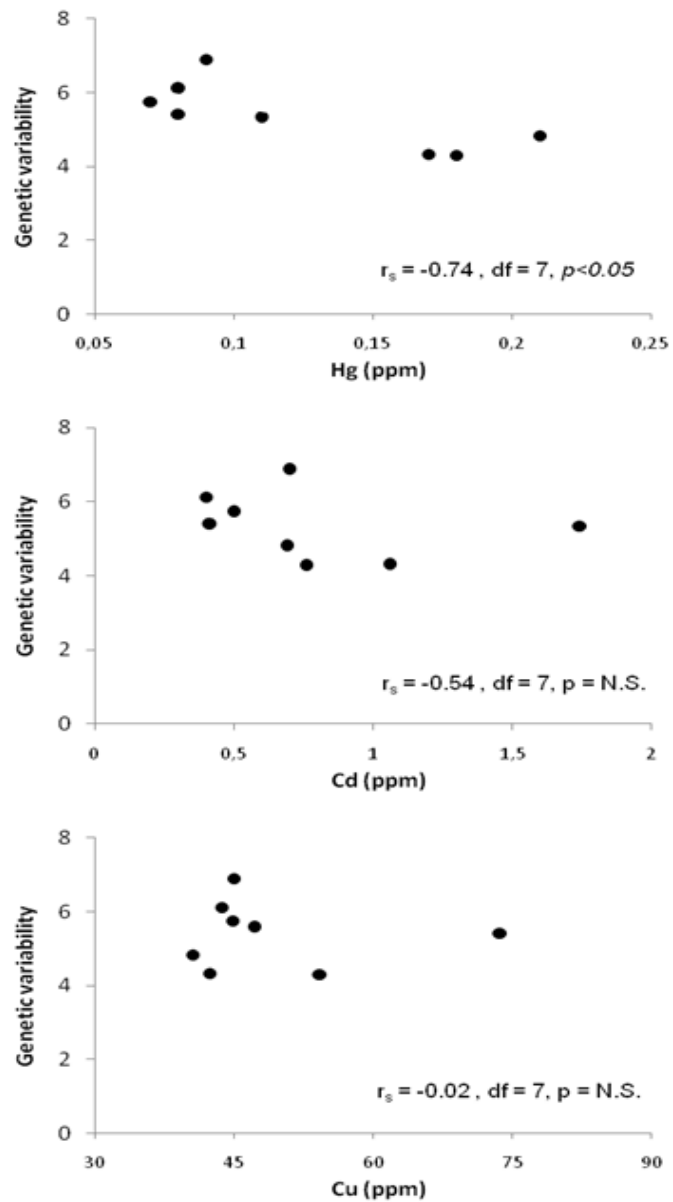
### 3.7 Trace metals accumulation and genetic diversity

Among all the metals analyzed, only Hg showed a significant correlation between metal concentration and genetic variability of populations ( $r_s = -0.74$ , d.f. = 7,  $p < 0.05$ ) (Fig. 4). In fact, the sandhoppers collected from the sampling sites with the highest Hg levels (RS = 0.21 ppm, FM = 0.18 ppm, AM = 0.17 ppm, Fig. 4) had the lowest levels of genetic variability (Table 2). There was no significant correlation between genetic diversity and metal concentration for Cd and Cu ( $r_s = -0.54$ , d.f. = 7,  $p = N.S.$  for Cd;  $r_s = -0.02$ , d.f. = 7,  $p = N.S.$  for Cu) (Fig. 4).

### 3.8 Coastal stability and genetic diversity

The sampling sites were divided into “stable” and “unstable” based on data recorded from late 1800 (Albani et al., 1940) to 2008 (Ferretti et al., 2003; Rossi et al., 2008). The Spearman rank-order correlation test did not show a significant correlation between coastal stability and genetic variability ( $r_s = -0.28$ , d.f. = 7,  $p = N.S.$ ).





**Fig. 4.** Relationship between trace metals concentrations in tissues of *T. saltator* (expressed in ppm) and genetic variability (expressed as mean number of pairwise differences). For each metal the value of Spearman rank – order correlation coefficient test ( $r_s$ ), degrees of freedom (df) and probability (p) are given. For further explanations see also Table 2

## 4 DISCUSSION

The results of our trace metals analysis agree with previous data regarding the Tuscan coast (Ugolini et al., 2004; 2008) and confirm the ability of sandhoppers to accumulate Hg, Cd and Cu showing differences among sampling sites (see Marsden and Rainbow, 2004 for a review).

The developed markers, based on two primers having a (CA)<sub>7</sub> and a (GA)<sub>9</sub> repeat motif (ISSR#5 and ISSR#9, respectively), resulted in 54 highly polymorphic markers which produced 502 alleles (bands) in 130 animals. In spite of the narrow geographical range, the analysis of private markers revealed that populations AF, P, C, FA present unique alleles, suggesting that the gene flow between populations is quite low or that several bottlenecks, with reduction in effective population size followed by rapid expansion, could have taken place. In this view, the mismatched distribution for populations AF, P and FA (data not shown) approximates a bimodal curve, which could support the hypothesis of bottlenecks for those populations. However, an analysis with other markers (e.g. co-dominant microsatellites) is needed to resolve this issue. Genetic diversity values varied relatively little. However, populations with no private alleles tended to have lower values of genetic diversity; in particular, populations RS and AM showed some of the lowest genetic diversity values. Populations with the lowest diversity values also inhabited sites heavily contaminated by Hg, and there was a significant negative correlation between Hg concentration and genetic variability of populations. Exposure to genotoxic chemicals such as Hg can act as a selective force, eliminating sensitive genotypes within a population with predictable changes in genetic variability in affected populations. Results of other studies support the correlation between Hg exposure and genetic diversity. Populations of the sunfish *Lepomis auritus* from Hg-contaminated rivers showed differences in genetic distances with respect to unexposed populations (Nadig et al., 1998). Individuals of the marine gastropod *Monodonta turbinata* from Hg-contaminated areas had high amounts of Hg-tolerant allozymes with respect to animals sampled in uncontaminated areas (Nevo et al., 1984). Our findings seem to confirm the important role of Hg contamination as a selective force in contaminated populations.

Hg contamination in the most polluted localities is well documented. RS is located near the Solvay chemical plant (built in 1918) whose effluents, characterized by high levels of Hg, discharge directly into the sea (Ferrara et al., 1989). AM is affected by the cinnabar (HgS) geological anomaly on Mt. Amiata and in particular by the Hg mining conducted from the Etruscan period (8<sup>th</sup> - 1<sup>st</sup> century B.C.) to 1980 (Barghigiani et al., 1996).

The high sensitivity of *T. saltator* to Hg contamination is also supported by the LC<sub>50</sub> data reported by Ungherese and Ugolini (2009). For this species, Hg is more toxic than Cu and Cd, with wide differences in the LC<sub>50</sub> values: 0.02 ppm for Hg, 13.28 for Cu and 27.66 for Cd (Ungherese and Ugolini, 2009). Therefore, although we cannot exclude the influence of other pollutants, Hg

seems to have an important role in the reduction of genetic variability in *T. saltator*. Moreover, on the Tuscan coast, genetic erosion has recently been detected in the littoral crab *Pachygrapsus marmoratus* from sites with different degrees of As, Cd, Pb and Cu contamination (Fratini et al., 2008). Our analyses did not reveal a correlation between coastal stability and genetic diversity, as proposed by other authors (Ketmaier et al., 2003; Scapini, et al., 2005). Therefore, contrary to the results of these authors, trace metals contamination (particularly Hg) rather than coastal stability seems to have a negative influence on the genetic diversity of *T. saltator* populations.

The gene flow between *T. saltator* populations was then investigated by analysis of the population structures. We found a good correlation between geographical distance and genetic distance between populations, in agreement with an isolation-by-distance model as previously proposed for this species over a larger geographical range (De Matthaeis et al., 2000). Moreover, we found structuring of populations in a northern and a southern group. In the latter, there was unexpected differentiation, even at a very small scale (AM-AF, about 600 m apart). Sympatric differentiation in tidal and estuarine animals due to behavioral and ecological causes has already been detected (Stanhope et al., 1992; Bilton et al., 2002; Vesakoski et al., 2009). However, further investigations into the eco-ethology and physiology of these two populations are necessary to fully understand the basis of the quasi-sympatric differentiation. In the northern Tuscany populations (FM, FA, C), only the last one (C) was differentiated from the others, revealing higher gene flow between northern populations than between southern ones. This suggests that local conditions have a high impact on the *T. saltator* population structure and may strongly influence gene flow between sites, even at a very small scale.

## 1. CONCLUSIONS

Talitrid amphipods such as the sandhopper *T. saltator* are well-established biomonitors of trace metals contamination. Despite their recognized role as bioindicators of human impact on sandy beaches, no molecular markers have been developed to allow rapid and high-throughput screening of genetic diversity in talitrids. We applied fluorescent Inter-Simple Sequence Repeats (fISSR) to *T. saltator*, aiming to investigate the genetic diversity and structure of eight populations inhabiting the Tyrrhenian (western) coast of central Italy and their relationships with trace metal contents (Hg, Cd, Cu). This study demonstrates the usefulness of fISSR markers in investigations of *T. saltator* population genetics. Indeed, these markers reveal differences among populations despite the small geographical range.

Our results also support the “genetic erosion” hypothesis (Van Straalen and Timmermans, 2002) and highlight the role of Hg pollution in the reduction of population genetic diversity. The Hg concentrations in the sandhopper tissues were negatively correlated to the genetic variability. Coastal stability seems not

to affect the genetic variability of sandhoppers. Therefore, genetic differences assessed with fISSR markers could be used as valid biomarkers to detect Hg exposure in *T. saltator* and could be used to identify coastal areas where Hg contamination is particularly strong.

### Acknowledgments

The research was financially supported by the Fondazione Monte dei Paschi (Siena) (grants 31017 and 33798 assigned to A. Ugolini). We are grateful to F. Luzzi for technical assistance with DNA manipulation. Thanks are due to the Ente Parco Regionale di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa) for authorizing the sampling.

### 6. REFERENCES

**Albani, D., Griselli, A. & Mori, A.** 1940. Le spiagge toscane. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

**Arlequin ver. 3.11.** An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>

**Barghigiani, C., Ristori, T. & Lopez Arenas, J.** 1996. Mercury in marine sediments from a contaminated area of the northern Tyrrhenian sea: <20 µm grain-size fraction and total sample analysis. *Science of the Total Environment*, **192**, 63-73.

**Belfiore, N.N. & Anderson, S.L.** 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, **489**, 97-122.

**Bickham, J.W., Sandhu, S., Herbert P.D.N., Chikhi, L. & Athwal, R.** 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*, **463**, 33-51.

**Bilton, D.T., Paula, J. & Bishop, J.D.D.** 2002. Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **55**, 937-952.

**De Matthaeis, E., Cobolli, M., Mattoccia, M. & Scapini, F.** 1995. Geographic variation in *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) – Biochemical evidence. *Bollettino di Zoologia*, **62**, 77-84.

**De Matthaeis, E., Davolos, D. & Cobolli, M.** 1998. Genetic divergence between populations and species of talitrids from Aegean Islands. *Journal of Heredity*, **89**, 37-43.

**De Matthaeis, E., Davolos, D., Cobolli, M. & Ketmaier, V.** 2000. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations of four talitrid species in the Mediterranean Sea. *Evolution*, **54**, 1606-1613.

**De Wolf, H., Blust, R. & Backeljau, T.** 2004. The population genetic structure of *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along a pollution gradient

in the Scheldt estuary (The Netherlands) using RAPD analysis. *Science of the Total Environment*, **325**, 59-69.

**Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, M.** 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.

**Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K.** 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 574-578.

**Ferrara, R., Maserti, E. & Paterno, P.** 1989. Mercury distribution in maritime sediments and its correlation with the *Posidonia oceanica* prairie in a coastal area affected by a chlor-alkali complex. *Toxicology and Environmental Chemistry*, **22**, 131-134.

**Ferretti, O., Delbono, I., Furia, S. & Barsanti, M.** 2003. *Elementi di gestione costiera. Parte Seconda. Erosione costiera. Lo stato dei litorali italiani*. Rapporto Tecnico ENEA RT/2003/43/CLIM.

**Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Špegys, M. & Rainbow, P.S.** 2009. The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as biomonitor of trace metals bioavailability in European coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **58**, 39-44.

**Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183-192.

**Fratini, S., Zane, L., Ragionieri, L., Vannini, M. & Cannicci, S.** 2008. Relationship between heavy metal accumulation and genetic variability decrease in the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus* (Decapoda; Grapsidae). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **79**, 679-686.

**Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K.** 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (Ed. by A. McLachlan & T. Erasmus), pp. 547-556, Junk Publ., The Hague.

**He, F., Kang, D., Ren, Y., Qu, L.J., Zhen, Y. & Gu, H.** 2007. Genetic diversity of the natural populations of *Arabidopsis thaliana* in China. *Heredity*, **99**, 423-431.

**Ketmaier, V., Scapini, F. & De Matthaeis, E.** 2003. Exploratory analysis of talitrid population genetics as an indicator of the quality of sandy beaches. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58**, 159-167.

**Lowe, A., Harris, S. & Ashton, P.** 2004. *Ecological genetics. Design, analysis, and application*. Blackwell, Oxford.

**Lynch, M. & Milligan, B.G.** 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91-99.

**Machkour-M'Rabet, S., Hénaut, Y., Dor, A., Pérez-Lachaud, G., Pélissier, C., Gers, C. & Legal, L.** 2009. ISSR (Inter Simple Sequence

Repeats) as molecular markers to study genetic diversity in tarantulas (Araneae, Mygalomorphae). *Journal of Arachnology*, **37**, 10-14.

**Maltagliati, F., Lai, T., Casu, M., Valdesalici, S. & Castelli, A.** 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 626-634.

**Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.

**Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.

**Moore, P.G. & Rainbow, P.S.** 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, **73**, 120-126.

**Moore, P.G., Rainbow, P.S. & Hayes, E.** 1991. The beach-hopper *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor for copper and zinc: North Sea trials. *Science of the Total Environment*, **106**, 221-238.

**Nadig, S.G., Lee, K.L. & Adams, S.M.** 1998. Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD. *Aquatic Toxicology*, **43**, 163-178.

**Nagaraju, J., Kathirvel, M., Subbaiah, E.V., Muthulakshmi & M., Kumar, L.D.** 2002. FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for high throughput genotyping and genetic mapping. *Molecular and Cellular Probes*, **16**, 67-72.

**Nevo, E., Ben-Schlomo, R. & Lavie, B.** 1984. Mercury selection of allozymes in marine organisms: prediction and verification in nature. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **81**, 1258-1259.

**Pazza, R., Kavalco, K.F., Prioli, S., Prioli, A.J. & Bertollo, L.A.C.** 2007. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, **35**, 843-851.

**Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P.** 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.

**Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D.** 1998. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193-200.

**Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **28**, 567-582.

**Rohlf, F.J.** 1990. NTSYS-pc. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.02. Exeter Software, New York.

**Rossi, S., Querci, P., Giovannoni, G. & Mastri, R.** 2008. *Relazione sullo stato dell'ambiente in Toscana 2008*. ARPAT- Regione Toscana, Edifir-Edizioni Firenze.

- Scapini, F., Campacci, F. & Audoglio, M.** 1999. Variation among natural populations of *Talitrus saltator* (Amphipoda): Morphometric analysis. *Crustaceana*, **72**, 659-672.
- Scapini, F., Chelazzi, L., Colombini, I., Fallaci, M. & Fanini, L.** 2005. Orientation of sandhoppers at different points along a dynamic shoreline in southern Tuscany. *Marine Biology*, **147**, 919-926.
- Semagn, K., Bjornstad, A. & Ndjiondjop, M.N.** 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 2540-2568.
- Siegel, S. & Castellan, J.J.N.** 1989. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2<sup>nd</sup> edition, McGraw Hill, New York.
- Slatkin, M.** 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Stanhope, M.J., Leighton, B.J. & Hartwick, B.** 1992. Polygenic control of habitat preference and its possible role in sympatric population subdivision in an estuarine crustacean. *Heredity*, **69**, 279-288.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Tan, G.L., Chu, Y.M., Chen, J.B. & Li, H.Q.** 2006. Genomic instability in the progression of sporadic nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngology. Head and Neck Surgery*, **134**, 147-152.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugolinii* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaponti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349-357.
- Ungherese, G. & Ugolini, A.** 2009. Sandhopper solar orientation as a behavioral biomarker of trace metals contamination. *Environmental Pollution*, **157**, 1360-1364.
- Van Straalen, N.M., & Timmermans, M.J.T.N.** 2002. Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the “genetic erosion” hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment*, **8**, 983-1002.
- Vesakoski, O., Rautanen, J., Jormalainen, V. & Ramsay, T.** 2009. Divergence in host use ability of a marine herbivore from two habitat types. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 1545-1555.

**Wink, M.** 2006. Use of DNA markers to study bird migration. *Journal of Ornithology*, **147**, 234-244.



# CAPITOLO 6

## **The amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on sandy beaches**

---

I dati presentati in questo capitolo sono stati oggetto di pubblicazione:  
A. Ugolini, G. Ungherese, S. Somigli, G. Galanti, D. Baroni, F. Borghini,  
N. Cipriani, M. Nebbiai, M. Passaponti, S. Focardi, 2008, “**The  
amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on  
sandy beaches**” Marine Environmental Research, Vol. 65, 349-357.



## ABSTRACT

The present paper assesses the use of the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of the effects of human trampling on the supralittoral sandy band. Samplings in delimited areas were carried out at sites subjected to different human impact. The results showed a strong negative correlation between the number of swimmers and the sandhopper population density, while there was no clear relationship between sandhopper abundance and the other factors considered: granulometry, compactness and organic carbon content of the sand, and trace metal contents in the sand and sandhoppers. A field test of trampling conducted in a confined space showed its direct negative effect on sandhopper survival. However, trace metal analysis confirmed the ability of *T. saltator* to bioaccumulate some elements (Hg, Zn, Cu, Cd). Our study demonstrates that *T. saltator* is a good bioindicator of human impact in the supralittoral zone of sandy shores.

**Keywords:** Human trampling, Heavy metals, Mediterranean sandy shores, Beaches, Bioindicator, Amphipod; *Talitrus saltator*.

## 1. INTRODUCTION

In the coastal zone, the input of materials and substances from terrestrial, fluvial and marine sources is particularly important. In addition to elevated concentrations of nutrients, there can be increased quantities of natural and anthropogenic contaminants. Since the 1960s, European shores (particularly Italian ones) have seen a very strong increase in the number of swimmers at beach resorts. Many studies on the submerged and intertidal littoral environment of rocky and sandy shores have dealt with the use of organisms as biomonitors of trace metal contamination. Similarly, many investigations have attempted to evaluate the effects of human trampling and recreational uses on natural populations and communities of the littoral zone of sandy shores (see Milazzo et al., 2002 for a review). In contrast, the supralittoral band, an ecotonal environment of great ecological importance in the economy of sandy shore ecosystems, has received relatively little attention (see Brown and McLachlan, 1994; Schlacher et al., 2007).

Most research on the effects of trampling on natural communities concerns the vegetation or macrofaunal components (especially birds) (Liddle, 1975; Brown and McLachlan, 1994). Several studies have examined the effects of trampling on the invertebrate fauna of rocky shores or of loose substrata of the intertidal zone (for instance see Povey and Keough, 1991; Brosnan and Crumrine, 1994; Chandrasekara and Frid, 1996; Casu et al., 2006; Dye, 2006; Johnson et al., 2007). Instead, there have been very few investigations of the supralittoral fauna of sandy shores and the results of these studies have been contradictory (Jaramillo et al., 1996; Moffet et al., 1998; Weslawski et al., 2000b, 2000c; Veloso et al., 2006). Recent studies have attempted to establish the utility of supralittoral amphipods as indicators of the impact of tourist activities on sandy shores (Fanini et al., 2005). However, because of their methods and sampling sites, the investigations have not provided clear results.

In summer, the supralittoral zone is intensely frequented by swimmers but it is also where the major consumers of stranded organic material, i.e. talitrid amphipods and isopod, find shelter during the day, buried in the wet sand. In fact, most of the energy flow deriving from the use of stranded material passes through supralittoral crustaceans (Branch and Branch, 1981; Griffiths et al., 1983; Brown and McLachlan, 1994). Sandhoppers occupy a trophic niche as detritivores and collector-gatherers. Hence they feed on plant and animal material from both marine and terrestrial sources (Palluault, 1954; Wildish, 1988; Bergerard, 1989), integrating the two routes of contamination of the supralittoral.

The aims of the present study were to examine the possibility of using the amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of the effects of human trampling on the supralittoral of sandy shores and to provide a simple low-cost monitoring tool. For this reason the relationship between sandhoppers abundance and swimmers has been considered, as well as the possible influence

of some other factors such as granulometric composition and sand compactness, organic carbon content in the sand and trace metal contamination.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. *Sandhopper sampling***

Samplings to determine the density of sandhoppers were carried out at eight sites on the coast of Tuscany subjected to different tourist impact and either with or without beach cleaning procedures. In the five sites inside the Regional Park of Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (MSRM Park, Pisa), the sampling was performed once a month from June to September 2004, 2005 and 2006:

O1: Oasi 1 (cleaned beach).

SM: Serchio Mare (seashore, not cleaned).

SF: Serchio Fiume (right bank of river mouth, not cleaned).

BV: Batteria Vecchia (not cleaned).

FM: Fiume Morto Vecchio (not cleaned).

At the three sites along the Feniglia sandbar (southern Tuscany, Grosseto), the sampling was performed in July and September 2005:

FA: Bathhouse (Ansedonia side, cleaned beach).

FB1: Beach ca. 1 km from FA (cleaned).

FB2: Beach ca. 2 km from FA (cleaned).

At each sampling, all the sandhoppers were captured (also disturbing the surface layer to sample those in the sediment) and counted inside four areas (75 cm<sup>2</sup> each) delimited by plastic containers inserted a few cm into the sand. Each container was inserted along the sea–land axis of the beach at a progressively increasing distance starting from the water line until the beginning of dry sand. At each site, the sampling was carried out twice, a few meters apart, since the distribution of sandhoppers in the band of wet sand does not seem to be uniform (Weslawski et al., 2000a).

At each sampling site, the people to the right and left of the shoreline, along a 150 m transect in the central hours of the day on the days with the highest tourist presence, were also counted (Saturday and Sunday). At some locations, the following factors were also analyzed to exclude differences between the sampling sites: (1) contents of trace metals in the sand and in the sandhoppers (Hg, Cr, Cd, Cu, Zn, Fe, Al, Pb); (2) compactness of the sand; (3) granulometric composition of the sand; (4) organic carbon content of the sand.

## 1.2 Trace metals

The trace metal analysis was conducted on sand samples collected from the zone frequented by the sandhoppers during the day and on adult individuals of *T. saltator* collected at all the sites. The animals were transported to the laboratory in plastic containers with sand and detritus from the sampling site and then sacrificed by freezing. At each site, a sample of sand was collected in the zone frequented by the sandhoppers during the day. We dehydrated the samples at 40 °C until they reached a constant weight and then were finely ground. Around 150 mg of each sample were mineralized in Teflon vessels containing 3 ml of HNO<sub>3</sub> at 120 °C for 8 h. After digestion, the solution was brought to a volume of 10 ml by addition of deionized water. During each mineralization, we performed several “blank trials”, by putting only the reagents in the Teflon containers, to verify the absence of contamination.

The analyses were performed by atomic absorption spectrometry. Cd, Cr, Cu and Pb were determined by atomization with a graphite furnace and Zeeman background corrector. The FIMS (flow injection mercury system) was used for Hg, while we determined Al, Fe and Zn by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP/EAS). Each analysis was carried out three times and the accuracy of the analytical procedures was assessed by comparing the results of contemporary digestions and analyses of standard reference materials, SRMs: SRM 1566a “oyster tissue” from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA). The results of the determination were only accepted if the values measured for the SRMs were within the certified concentration range; if not, we repeated the analyses. The element concentrations (expressed as µg/g) were calculated by the method of “internal additions”. The coefficients of variation for the various elements were between 5% and 10%.

## 2.3. Granulometric composition and sand compactness

For the granulometric analysis, the sand samples were split to obtain samples of approximately 10 g (the choice of the representative volume was based on the median of the sediment, as estimated by visual examination).

A statistically representative portion of the sample was placed in an oven at 80 °C to eliminate the humidity, after which we sifted the material through a series of progressively finer sieves (2500 µm, 1600 µm, 1000 µm, 630 µm, 400 µm, 250 µm, 160 µm, 100 µm, 63 µm) for around 5 min with a Ro-Tap shaker. Since the samples were prevalently sandy, it was not necessary to analyze the mud-clay fraction (<63 µm) of the sediment.

To assess the compactness of the sand in the zone frequented by sandhoppers during the day, an aluminum pole was dropped from a height of 1 m and the distance the pole penetrated into the sand was measured. The distance was transformed into arbitrary units by assigning a value of 100% compactness to 0 cm and 50% compactness to 10 cm.

#### **2.4. Organic carbon**

The sand samples were collected at each site in July 2006. The organic carbon in the sand samples was determined as the difference between the total carbon and the inorganic carbon. The sand was crushed to a fine powder so as to homogenize the sample. Total carbon was determined with a CHNS/O ANALYZER (mod. 2400 ser. II, Perkin Elmer), while inorganic carbon was measured with a De Astis calcimeter.

#### **2.5. Trampling test**

The trampling test was carried out at Fiume Morto Vecchio (MSRM Park). Two plastic cylinders (110 cm diameter) were fixed in the sand in the wet band frequented by sandhoppers during the day. All the individuals inside each of the delimited areas were captured, counted and then freed within the same area. After around 15 min (sufficient time for the sandhoppers to return to their refuges in the wet sand), two people performed 400 footsteps in 15 min inside one of the two cylinders. The number of footsteps was chosen on the basis of the footsteps recorded during a survey carried out from 11:00 to 12:00 on a Saturday in July 2006 on the Marina di Pietrasanta beach (a popular beach on the Tuscan coast). During this survey, a mean transit of 866 swimmers per hour at a selected point on the shoreline was recorded. The sandhoppers within the other cylinder were left undisturbed. At the end of the trial, the sandhoppers still alive in both cylinders were captured, counted and transported to the laboratory in basins with wet sand. The numbers of individuals still alive 24 h after the treatment was also recorded.

#### **2.6. Statistical analysis**

The granulometric data were analyzed with specific software (Department of Earth Sciences, University of Florence) that provided parametric statistics indicative of the sorting of the samples, as well as the percentages of the granulometric classes for the purposes of textural classification (Shepard, 1954).

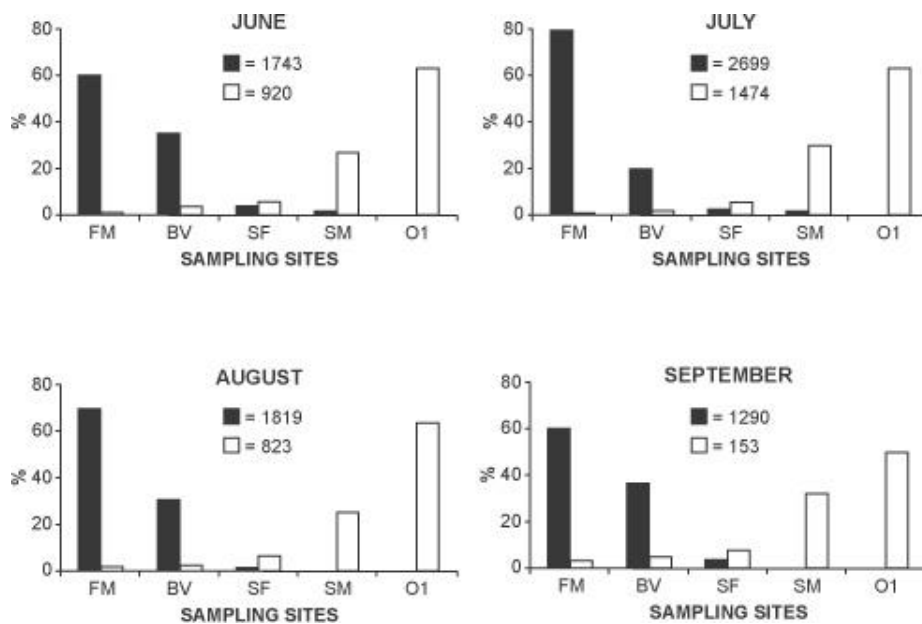
The statistical analysis of sandhopper density was performed independently of an analysis of natural population fluctuations (see Anastácio et al., 2003; Marques et al., 2003) and/or a comparison of the population densities at different sites. Such analyses were beyond the scope of our study and would not have provided information useful for our aims. It is possible that sandhopper populations living in the same environment and practically at the same latitude (ca. 200 km apart) present small differences in the natural fluctuation of population density. However, since we performed relative comparisons of the number of captured individuals among several localities of the same zone, any differences in population density between different zones in the same period of the year would not affect the interpretation of the results. The tests used are among the most common ones in non-parametric statistics (Zar, 1984; Siegel and Castellan, 1989).

The possible influence of trace metal pollution on sandhopper density was assessed with the Spearman rank-order correlation coefficient test (Siegel and Castellan, 1989). In the figure illustrating trace metal pollution, we arranged the sampling sites in decreasing order of sandhopper density: the site with the highest sandhopper abundance in July 2006 (FM, captured sandhoppers = 1013) was given the arbitrary value of 100. The values for the other sites were expressed as a percentage of FM.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Sandhopper density

The frequency of *T. saltator* individuals collected at the MSRM Park sites was negatively correlated with the frequency of swimmers (Fig. 1).



**Fig. 1.** Frequency (% of total numbers) of captured sandhoppers (black bars) and swimmers (white bars) for each month of sampling. The order of the sampling sites is based on the number of swimmers observed at each locality: FM = Fiume Morto; BV = Batteria Vecchia; SF = Serchio Fiume; SM = Serchio Mare; O1 = Oasi 1. The total numbers of sandhoppers and swimmers at all five sites are also given.

Despite the small sample sizes, statistical significance was reached for each of the four months (June–September) (June and July,  $r_s = -1$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.01$ ; August and September,  $r_s = -0.925$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ , Spearman rank-order



correlation coefficient test, Fig. 1). This is also confirmed considering the mean number of sandhoppers and swimmers (Tab. 1). In fact, the Fiume Morto Vecchio site (FM) consistently had the lowest tourist impact and the highest sandhopper abundance (Table 1). In contrast, no sandhoppers were found at the site with the highest tourist impact, Oasi 1 (Tab. 1).

**Tab. 1** Captured sandhoppers and number of swimmers (mean  $\pm$  SD; n = 3) for each month of sampling

Sampling sites		June	July	August	September
<b>FM</b>	sandhoppers	348.3 $\pm$ 59	709 $\pm$ 332	438 $\pm$ 466	256 $\pm$ 325
	swimmers	1.3 $\pm$ 1.5	4 $\pm$ 2	3.6 $\pm$ 4.4	1.66 $\pm$ 1.5
<b>BV</b>	sandhoppers	204 $\pm$ 85	174 $\pm$ 40	184.6 $\pm$ 104	158 $\pm$ 192
	swimmers	10 $\pm$ 13	6 $\pm$ 2.6	6.6 $\pm$ 9	1.3 $\pm$ 1.5
<b>SF</b>	sandhoppers	21 $\pm$ 31	15 $\pm$ 15	2.3 $\pm$ 4	16.3 $\pm$ 18
	swimmers	18 $\pm$ 19	25.6 $\pm$ 15	18.6 $\pm$ 12	4.3 $\pm$ 5
<b>SM</b>	sandhoppers	8 $\pm$ 12	1.33 $\pm$ 1.5	0	0
	swimmers	82 $\pm$ 70	146 $\pm$ 137	70 $\pm$ 21.2	16.6 $\pm$ 13.5
<b>O1</b>	sandhoppers	0	0	0	0
	swimmers	196 $\pm$ 190	310 $\pm$ 134	175 $\pm$ 76	28.6 $\pm$ 17.8

The July vs. September comparison for the various sampling sites was statistically significant for the localities in the MSRM Park ( $G = 114.5$ ,  $df = 4$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 1) but not for the sites on the Feniglia sandbar ( $G = 1.9$ ,  $df = 2$ ,  $p > 0.1$ , G test, Fig. 3).

There was a significant monthly difference in sandhopper abundance even at a single locality with very low tourist impact (Fiume Morto Vecchio, Table 1, Fig. 2,  $G = 664$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ , G test) due to the natural population fluctuation. However, these differences did not affect the swimmers–sandhoppers relationship.

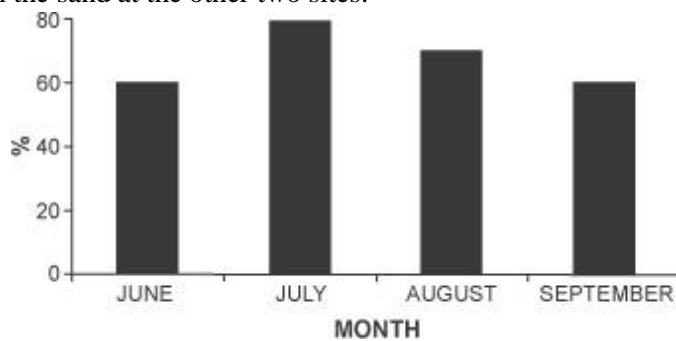
It was not possible to make statistical comparisons for the Feniglia sandbar (Fig. 3) because of the small number of sampling sites. Nevertheless, the number of sandhoppers captured at the Feniglia sites clearly followed the same trend in relation to tourist impact as the one recorded at the MSRM Park sites, i.e. localities with higher tourist impact had lower *T. saltator* densities.

Regarding the possible influence of beach cleaning on sandhopper survival, there was a significant difference between the only cleaned site (O1,  $n = 0$ ) and the total of the other MSRM sites (SM + SF + BV + FM,  $n = 7551$ ;  $G = 10,434$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.0001$ , G test). However, there were also significant

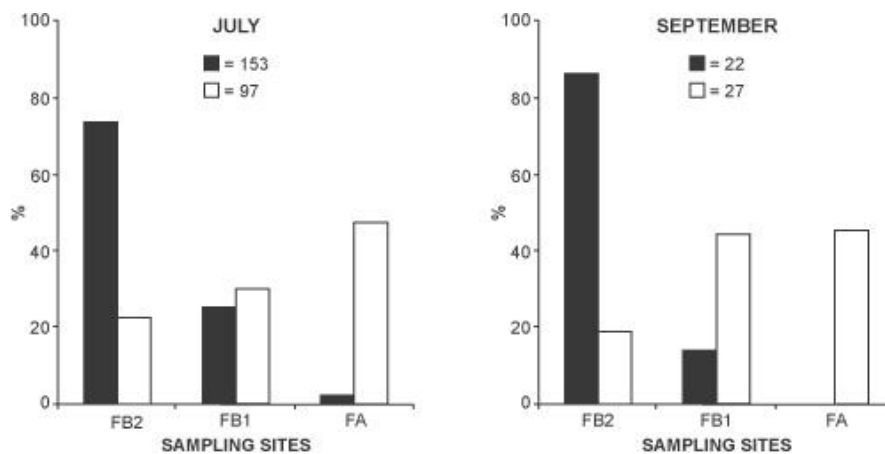
differences among the not cleaned sites (SM,  $n = 28$ ; SF,  $n = 164$ ; BV,  $n = 2160$ ; FM,  $n = 5\,199$ ;  $G = 10,077$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0.0001$ ,  $G$  test). A similar result was obtained for the cleaned beaches of the Feniglia sandbar (FA,  $n = 131$ ; FB1,  $n = 41$ ; FB2,  $n = 3$ ;  $G = 164$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.01$ ,  $G$  test).

### 3.2. Trace metals

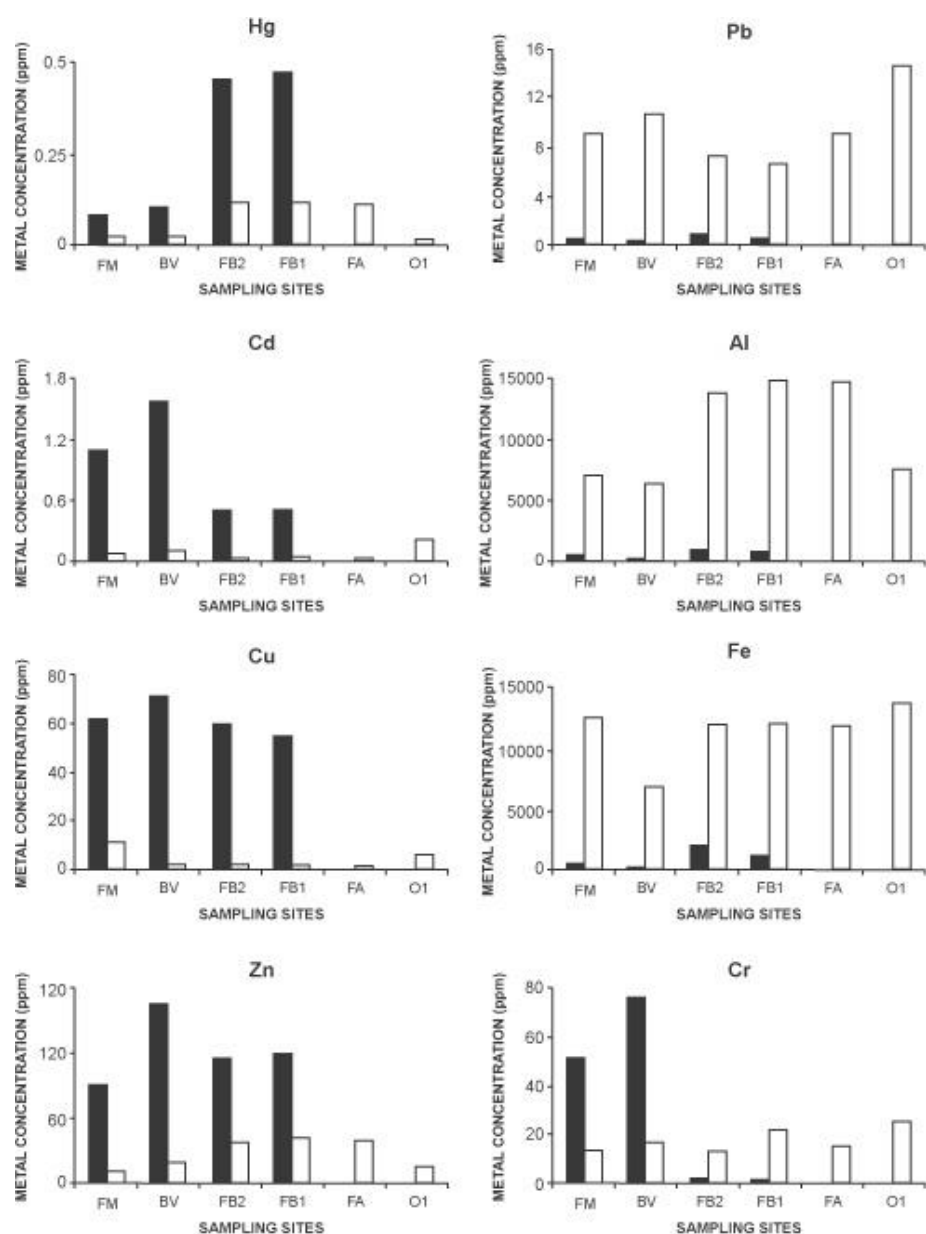
At the sites with sandhoppers, the Cu, Cd, Hg and Zn concentrations (Fig. 4) were constantly higher in the sandhoppers than in the sand. In contrast, the Fe, Pb and Al contents (Fig. 4) were higher in the sand than in the sandhoppers. For Cr, there was a higher concentration in the sandhoppers at two sites and in the sand at the other two sites.



**Fig. 2.** Monthly variation of sandhopper numbers (% of total sampled) at Fiume Morto (FM). Total number of sandhoppers collected = 5199.



**Fig. 3.** Frequency (% of total numbers) of captured sandhoppers (black bars) and swimmers (white bars) along the Feniglia sandbar in July and September. The order of the sampling sites is based on the number of swimmers observed at each locality: FA = Feniglia bathhouse, FB1 = 1 km from bathhouse, FB2 = 2 km from bathhouse. The total numbers of sandhoppers and swimmers at all three sites are also given.



**Fig. 4.** Trace metal concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry wt) in the sand (white bars) and in the sandhoppers (black bars). For each element, the sampling sites are ordered according to decreasing frequency of sandhoppers recorded in July 2006. For further explanations, see Figs. 1 and 3 and text.

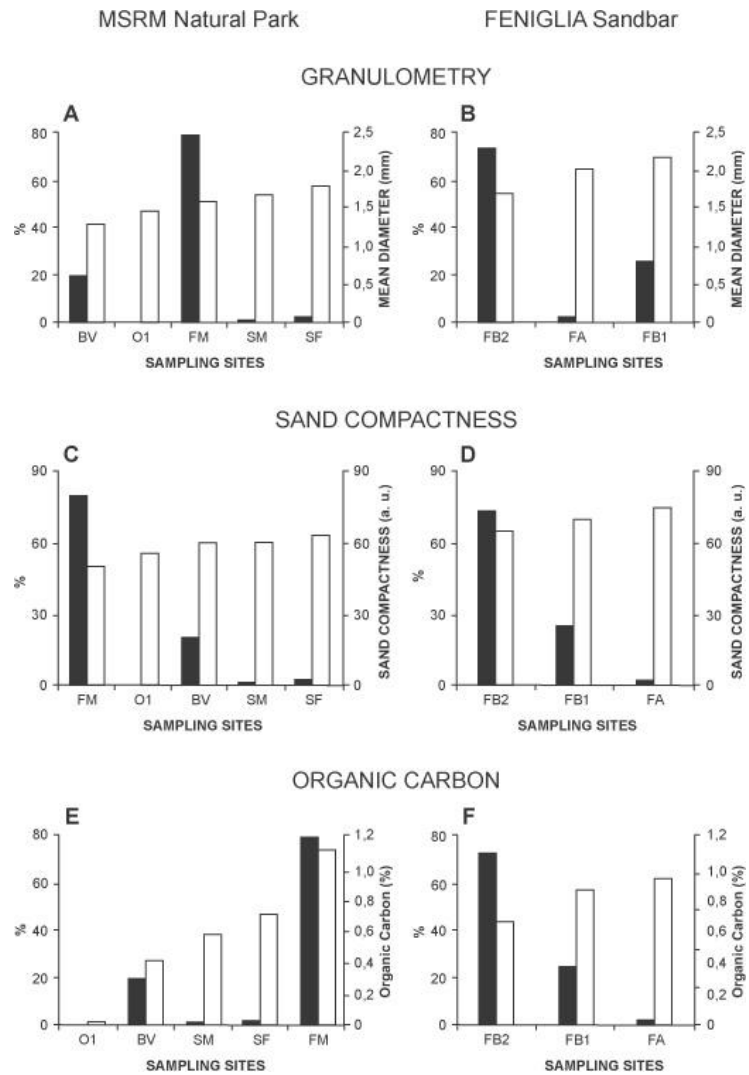
There was no significant correlation between sandhopper abundance (in Fig. 4 abscissa, the sites are in decreasing order of abundance) and trace metal contents in the individuals or in the sand ( $p = \text{NS}$  in each case,  $n = 6$ , Spearman rank-order correlation test).

### 3.3. *Granulometric composition and sand compactness*

The granulometric composition of the sand was fairly uniform among sites: all samples were well classified and in the medium- to coarse-grained range (Table 2). For the MSRM Park sites, there was no correlation between mean sand grain diameter and sandhopper density (Spearman rank-order correlation coefficient test,  $r_s = -0.1$ ,  $n = 5$ ,  $p = \text{NS}$ , Fig. 5A). A qualitative evaluation also suggested a lack of correlation between sandhopper abundance and mean sand grain diameter at the Feniglia localities (Fig. 5B). Sand compactness at the MSRM Park sites (Fig. 5C) was not significantly correlated with the number of sandhoppers ( $r_s = -0.175$ ;  $n = 5$ ,  $p = \text{NS}$ , Spearman rank-order correlation coefficient test). Indeed the highest values occurred at site SF where sandhoppers were present (Fig. 5C). For the Feniglia sites, a qualitative evaluation indicated a negative correlation between sand compactness and sandhopper abundance (Fig. 5D).

**Tab. 2** Results of the granulometric analysis for each sampling site.

Sampling sites	Mean sand grain diameter (mm)	Standard deviation	Skewness	Kurtosis
<b>FM</b>	1.605	0.471	-0.012	0.503
<b>BV</b>	1.324	0.507	0.247	0.494
<b>SF</b>	1.751	0.506	0.180	0.598
<b>SM</b>	1.669	0.469	0.051	0.582
<b>O1</b>	1.484	0.486	0.170	0.543
<b>FB2</b>	1.738	0.436	0.234	0.631
<b>FB1</b>	2.166	0.435	-0.043	0.511
<b>FA</b>	2.032	0.489	0.065	0.552



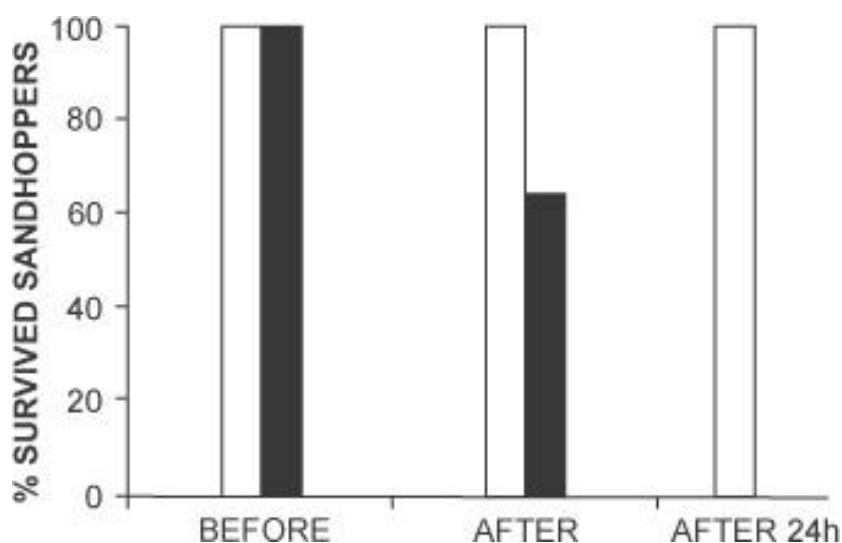
**Fig. 5.** A–B: mean sand grain diameter (white bars) and frequency of captured sandhoppers (black bars; % of total numbers). The order of the sampling sites is based on mean diameter. C–D: sand compactness (white bars) expressed in arbitrary units (a.u.) and frequency of captured sandhoppers (black bars). The order of the sampling sites is based on sand compactness. E–F: percentage of organic carbon in the sand (white bars) and frequency of captured sandhoppers (black bars). The order of the sampling sites is based on percentage of organic carbon. For further explanations, see Figs. 1 and 3.

### 3.4. Organic carbon

For the MSRM Park sites, the organic carbon content of the sand was not significantly correlated with sandhopper density ( $r_s = 0.7$ ,  $n = 5$ ,  $p = \text{NS}$ ; Spearman rank-order correlation coefficient test, Fig. 5E). However, the localities along the Feniglia sandbar showed a negative correlation between the two parameters (Fig. 5F).

### 3.5. Trampling test

The effect of trampling on *T. saltator* survival (Fig. 6) was evident immediately after the treatment: the difference between the number of live individuals before and after treatment was highly significant ( $G = 86$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ , G test). After 24 h, the percentage of surviving sandhoppers dropped almost to zero ( $G = 428$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ , G test) while the survival of the control sandhoppers remained the same.



**Fig. 6.** Frequency of surviving sandhoppers subjected to the trampling test (black bars) and controls (white bars). Before = before the test, After = after the test, 24 h = 24 h after the beginning of the test. See text for further details.

#### 4. DISCUSSION

Of all the factors that might have negatively influenced the population density of *T. saltator*, only the number of swimmers showed a significant correlation with the number of captured sandhoppers. Although the effect of trampling in a confined test space is probably not the same as in natural conditions (in which case the animals could escape), our test results are the first direct proof that human trampling affects sandhopper survival. This is likely an important factor at Mediterranean latitudes and for species that burrow only slightly into the sand (ca. 3–5 cm depth).

This does not mean that other factors are never influential, only that they are not particularly important in the conditions encountered in this study. Sand compactness probably has a negative effect on sandhopper abundance beyond a certain threshold: a particularly compact substrate could hinder burrowing, thus reducing the probability of survival. However, sites like BV and SF, where sandhoppers were present, had more compact sand than O1, where sandhoppers were never found. The negative correlation at the Feniglia sites probably depended on the fact that the increasing order of sand compactness at the sites corresponded to an increasing order of tourist impact. Furthermore, the sand compactness at O1, where sandhoppers were absent, was lower than at FB2 and FB1 where sandhoppers were present. Therefore, sand compactness does not seem to be a primary determinant of *T. saltator* population density.

There did not appear to be any relationship between sandhopper abundance and sand grain size at the various sites. In fact, *T. saltator* lives on beaches with sand that ranges from medium- to coarse-grained (i.e. from around 0.5–2 mm, Ugolini et al., 1995). All the locations considered in this study fell within this range.

The results for organic carbon suggested a negative correlation with sandhopper abundance at the Feniglia sandbar sites. However, as for sand compactness, the increasing order of organic carbon content at the sites corresponded to an increasing order of tourist impact. In addition, the FM site (MSRM Park) had a high sandhopper abundance but a higher organic carbon content than at FA where there were very few sandhoppers (but many swimmers).

The trace metal analysis confirmed *T. saltator*'s good ability to bioaccumulate Hg, Cu, Cd and Zn (Rainbow and Moore, 1986; Moore and Rainbow, 1987; Rainbow, 1998; Rainbow et al., 1998a, 1998b; Marsden and Rainbow, 2004; Ugolini et al., 2004, 2005). Although there were some differences in trace metal contamination among sites, there was no clear relationship with the abundance of sandhoppers. Hg accumulation seemed to be negatively correlated with sandhopper abundance at the various sites (Fig. 4). Nevertheless, the Hg concentration in the sand was lowest at O1 where there were no sandhoppers. Thus, the absence of sandhoppers at O1 and the low

density at FA cannot be attributed to Hg contamination. Furthermore, the trace metal concentrations in both the sandhoppers and sand samples were much lower than those sandhoppers or beachflies were present (Rainbow et al., 1998a, 1998b; Fialkowski et al., 2000; Ugolini et al., 2004).

Since we did not evaluate the effects of beach cleaning separately from the effects of trampling, we cannot exclude a possible influence of beach cleaning on sandhopper density. Nevertheless, at the sampling sites not subjected to mechanical beach cleaning, sandhopper abundance still varied in relation to the different tourist impact. In fact, the sandhopper distributions along the Feniglia sandbar (where the beach is regularly cleaned) and at Fiume Morto Vecchio and Batteria Vecchia (where beach cleaning is not carried out) all presented the same pattern in relation to the numbers of swimmers. Therefore, contrary to the hypothesis of Fanini et al. (2005), trampling rather than beach cleaning has a negative effect on the survival of sandhoppers. We can also add a qualitative datum: at site O1, the one with the highest tourist impact in the MSRM Park, we never captured any sandhoppers during the present research, whereas hundreds of sandhoppers were regularly collected around 25 years ago when the zone had no beach resorts and swimming was forbidden.

We studied populations living within 200 km of each other and thus subject to very similar general climatic and environmental conditions. Therefore, the natural fluctuations of population density are probably synchronous. In any case, since the proposed method is based on the comparison of densities recorded at the various sites in the same time period, it is independent of natural population fluctuations and does not require biodiversity estimates for the considered environment. Hence, the method is simple and low-cost. Other recently proposed methods using sandhoppers to assess human disturbance are based on quantification of the variability of spatialtemporal habitat use (ElGtari et al., 2002; Nardi et al., 2003; Fanini et al., 2005; Scapini et al., 2005) or on determination of the degree of genetic variability (Ketmaier et al., 2003). However, *T. saltator*'s high behavioral plasticity and remarkable ability to learn new directions of the sea-land axis of the beach (see Ugolini and Macchi, 1988; Ugolini and Scapini, 1988; Ugolini et al., 1988) prevent a reliable and rapid determination of the reasons for variability in orientation behavior. The determination of genetic variability is interesting but not easily performed. Therefore, since these methods require specific expertise in various fields, sophisticated analytical techniques and complex statistical analyses, their practical application appears to be problematic.

The effect of human trampling and heavy tourist use of beaches on sandhopper populations raises the question of their conservation. *T. saltator* is a good osmoregulator (Morritt, 1988; Calosi et al., 2007) and metapopulations of this species are also found on the shores of retrodunal pools and on riverbanks near the mouth (Ugolini and Macchi, 1988; Ugolini and Scapini, 1988; Ugolini



et al., 1988). These places are usually shunned by swimmers and if protected could be valid reserves for natural (spontaneous migrations) or artificial sandhopper repopulation of the adjacent beaches.

In conclusion, (1) our method is reliable and low-cost, (2) *T. saltator* is a good biomonitor of trace metal pollution (Cu, Hg, Zn, Cd), and (3) this species is a valid bioindicator of the effects of human trampling and could be used for ecocompatible management of the tourist impact on the supralittoral zone.

### Acknowledgments

The research was funded by the Fondazione Monte dei Paschi (Siena) (Grant 31017), Ente Parco Regionale di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa), Centro Interuniversitario di Biologia Marina (CIBM, Livorno) and the University of Florence (local funds ex-60%) assigned to A.Ugolini.

### 5. REFERENCES

- Anastácio, P.M., Gonçalves, S.C., Pardal, M.A. & Marques, J.C. 2003. A model for amphipod (*Talitrus saltator*) population dynamics. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58** (Suppl. 1), 149–157.
- Bergerard, J. 1989. Ecologie des laisses de marée. *Année Biologique* **28**, 39–54.
- Branch, G. & Branch, M. 1981. *The Living Shores of Southern Africa*. G. Struik Publication, Cape Town, South Africa.
- Brosnan, D.M. & Crumrine, L.L. 1994. Effects of human trampling on marine rocky shore communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **177**, 79–97.
- Brown, A.C. & McLachlan, A. 1994. *Ecology of Sandy Shores*. Elsevier, Amsterdam.
- Calosi, P., Morritt, D., Chelazzi, G. & Ugolini, A. 2007. Physiological capacity and environmental tolerance in two sandhoppers species with contrasting geographical ranges: *Talitrus saltator* and *Talorchestia ugolinii*. *Marine Biology* **151**, 1647–1655.
- Chandrasekara, W.U. & Frid, C.L.J. 1996. Effects of human trampling on tidalflat infauna. *Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystems*, **6**, 299–311.
- Casu, D., Ceccherelli, G., Curini-Galletti, M. & Castelli, A. 2006. Human exclusion from rock shores in a Mediterranean marine protected area (MPA): an opportunity to investigate the effects of trampling. *Marine Environmental Research*, **62**, 15–32.
- Dye, A.H. 2006. Persistent effects of physical disturbance in mangrove sediments. *Marine Environmental Research*, **62**, 341–355.
- ElGtari, M., Charfi-Chikhrouha, F., Marchetti, G.M. & Scapini, F. 2002. Behavioural adaptation of *Talitrus saltator* populations to beaches with

- different dynamics and degree of human disturbance along Tunisian coasts. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, **47**, 643–650.
- Fanini, L., Cantarino, C.M. & Scapini, F.** 2005. Relationships between the dynamics of two *Talitrus saltator* populations and the impacts of activities linked to tourism. *Oceanologia*, **47**, 93–112.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183–192.
- Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K.** 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (Ed. by A. McLachlan & T. Erasmus), pp. 547–556, Junk Publ., The Hague.
- Jaramillo, E., Contreras, H. & Quijon, P.** 1996. Macroinfauna and human disturbance in a sandy beach of south-central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **69**, 655–663.
- Johnson, G.E.L., Attrill, M.J., Sheehan, E.V. & Somerfield, P.J.** 2007. Recovery of meiofauna communities following mudflat disturbance by trampling associated with crab-tiling. *Marine Environmental Research*, **64**, 409–416.
- Ketmaier, V., Scapini, F. & De Matthaeis, E.** 2003. Exploratory analysis of talitrid population genetics as an indicator of the quality of sandy beaches. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58** (Suppl. 1), 159–167.
- Liddle, M.J.** 1975. A selective review of the ecological effects of human trampling on natural ecosystems. *Biological Conservation*, **7**, 17–36.
- Marsden, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in Crustaceans affect their ecology – the Amphipods example?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300** 373–408.
- Marques, J.C., Gonçalves, S.C., Pardal, M.A., Chelazzi, L., Colombini, I., Fallaci, M., Bouslama, M.F., El Gtari, M., Charfi-Cheikhrouha, F. & Scapini, F.** 2003. Comparison of *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) biology, dynamics, and secondary production in Atlantic (Portugal) and Mediterranean (Italy and Tunisia) populations. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58** (Suppl. 1), 127–148.
- Milazzo, M., Chemello, R., Badalamenti, F., Camarda, R. & Riggio, S.** 2002. The impact of human recreational activities in marine protected areas: What lessons should be learnt in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology*, **23** (Suppl. 1), 280–290.
- Moffet, M.D., McLachlan, A., Winter, P.E.D. & De Ruyck, A.M.C.** 1998. Impact of trampling on sandy beach macrofauna. *Journal of Coastal Conservation*, **4**, 87–90.
- Moore, P.G. & Rainbow, P.S.** 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, **73**, 120–126.

- Morritt, D.** 1988. Osmoregulation in littoral terrestrial talitroidean amphipods (Crustacea) from Britain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **123**, 77–94.
- Nardi, M., Morgan, E. & Scapini, F.** 2003. Seasonal variation in the freerunning period in two *Talitrus saltator* populations from Italian beaches differing in morphodynamics and human disturbance. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58** (Suppl. 1), 199–206.
- Palluault, M.** 1954. Notes ecologiques sur le *Talitrus saltator*. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, **91**, 105–129.
- Povey, A. & Keough, M.J.** 1991. Effects of trampling on plant and animal populations on rocky shores. *Oikos*, **61**, 355–368.
- Rainbow, P.S.** 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: *Metal Metabolism in Aquatic Environment*, (Ed. by W.J. Langston & M.J. Bebianno), Chapman and Hall, London, pp. 285–319.
- Rainbow, P.S. & Moore, P.G.** 1986. Comparative metals analyses in amphipod crustaceans. *Hydrobiologia*, **141**, 273–289.
- Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D.** 1998a. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193–200.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1998b. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **28**, 567–582.
- Scapini, F., Chelazzi, L., Colombini, I., Fallaci, M. & Fanini, L.** 2005. Orientation of sandhoppers at different points along a dynamic shoreline in southern Tuscany. *Marine Biology*, **147**, 919–926.
- Schlacher, T.A., Dugan, J., Schoeman, D.S., Lastra, M., Jones, A., Scapini, F., McLachlan, A., Defeo, O.** 2007. Sandy beaches at the brink. *Diversity and Distributions*, **13**, 556–560.
- Shepard, F.P.** 1954. Nomenclature based on sand–silt–clay ratios. *Journal of Sedimentary Petrology*, **24**, 151–158.
- Siegel, S. & Castellan Jr. J.N.** 1989. *Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2<sup>nd</sup> edition McGraw Hill, New York.
- Ugolini, A. & Macchi, T.** 1988. Learned component in the solar orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda: Talitridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **121**, 79–87.
- Ugolini, A. & Scapini, F.** 1988. Orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) living on dynamic sandy shores. *Journal of Comparative Physiology*, **162**, 453–462.
- Ugolini, A., Scapini, F., Beugnon, G. & Pardi, L.** 1988. Learning in zonal orientation of sandhoppers. In: *Behavioral Adaptations to Intertidal Life* (Ed. by G. Chelazzi & M. Vannini) pp. 115–118. ASI Series Vol. **151**, Plenum Press, New York.

- Ugolini, A., Felicioni, S., Ruffo, S. & Cipriani, L.** 1995. Distribution of *Talorchestia ugonii* and other sandhoppers in Corsica. *Bollettino di Zoologia*, **62**, 291–296.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526–532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugonii* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328–1334.
- Veloso, V.G., Silva, E.S., Caetano, C.H.S. & Cardoso, R.S.** 2006. Comparison between the macrofauna of urbanized and protected beaches in Rio de Janeiro State, Brazil. *Biological Conservation*, **127**, 510–515.
- Weslawski, J.M., Kupidura, K. & Zabicki, M.** 2000a. Sandhoppers, *Talitrus saltator* (Montagu), at the Polish Baltic coast: seasonal and spatial distribution patterns. *Crustaceana*, **73**, 961–969.
- Weslawski, J.M., Stanek, A., Siewert, A. & Beer, N.** 2000b. The sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) on the Polish Baltic coast. Is it a victim of increased tourism?. *Oceanological Studies*, **29**, 77–87.
- Weslawski, J.M., Urban-Malinga, B., Kotwicki, L., Opalinski, K., Szymelfenig, M. & Dutkowski, M.** 2000c. Sandy coastlines: are there conflicts between recreation and natural values? *Oceanological Studies*, **29**, 5–18.
- Wildish, D.J.** 1988. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology*, **66**, 2340–2359.
- Zar, J.H.** 1984. *Biostatistical Analysis*, 2<sup>nd</sup> edition. Prentice-Hall, New Jersey.

# CAPITOLO 7

## **Sandhoppers, beachfleas and Mediterranean beach contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**

---

I risultati presentati nel seguente capitolo sono stati ottenuti in collaborazione con il Dott. G. Ungherese (Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università di Firenze), il Dott. G. Perra (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena) e il Prof. A. Ugolini.



## ABSTRACT

This study evaluates the use of *Talitrus saltator* (sandhopper) and *Orchestia montagui* (beachflea) as bioindicators of PAHs contamination of the supralittoral zone of Mediterranean sandy and rocky shores. The possible influence of season on their accumulation capability has been taken into account.

We used adult Amphipods collected at 16 localities on the Tuscan (14) and Libyan (2) shores in summer and winter. Concentrations of 16 PAHs indicated as priority pollutants by the Environmental Protection Agency (EPA) were determined. *T. saltator* can accumulate all the 16 PAHs analyzed whilst *O. montagui* 12 out of 16.

We found a great variability in the concentration of PAHs present in the substrata, sandhoppers and beachfleas. However, taking into account the seasonal variation of PAHs bioavailability which could affect the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in these animals, *T. saltator* could be used as bioindicator of PAHs contamination of the supralittoral zone of sandy shores.

## 1. INTRODUCTION

Coastal areas are subjected to a strong input of materials and substances from terrestrial, fluvial and marine sources. A group of widespread contaminants are the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which have been intensively studied in the various compartments of the environment (McElroy et al., 1989) because of their carcinogenic and mutagenic properties (Lehr & Jerina, 1977). PAHs are of concern because of their toxicity, persistence, and difficult remediation. The US Environmental Protection Agency regulates sixteen PAHs as priority pollutants, seven of which are known carcinogens. Certain PAHs are also classified as persistent organic pollutants (POPs) and persistent bioaccumulative chemicals (PBTs). These compounds have mainly anthropogenic origins, released in the environment through industrial processes such as manufactured gas plants, wood treatment facilities, household heating, and road transport (Rost et al., 2002).

Most of the PAH inputs in the marine ecosystem are linked to human activity. Industrial activities such as metal smelting (Naes et al., 1995; Beyer et al., 1996) and the electrolytic production of aluminium (Beyer et al., 1998) also release PAHs into rivers, estuaries and inshore waters. Coastal waters additionally receive a large amount of these organic compounds from products such as creosote, coal tar and coal tar pitch which are used as preservatives and antifouling agents (Uthe and Musial, 1986). PAHs can be introduced in the aquatic environment also by combustion of organic matter (pyrolytic origin), petroleum hydrocarbons and short-term degradation of biogenic precursors (diagenesis).

It is also worthy to remember that in the Mediterranean basin there are 82 petroleum harbors, moreover ship traffic tied up to oil and its by-products transport represent more than a half of commercial ship traffic (Legambiente 2007).

In many studies, bioindicators have been used to monitor contamination by PAHs in the marine (subtidal) environment (Meador et al., 1995; Baumard et al., 1998; Sanz-Lázaro et al., 2008). However, the supralittoral zone, characterized by a strong input of these compounds, has received little attention.

The supralittoral is the zone where the major consumers of stranded organic material, i.e. talitrid Amphipods and Isopods, find shelter during the day, buried in the wet sand or stranded organic material. In fact, most of the energy flow deriving from the use of stranded material passes through supralittoral crustaceans (Griffiths et al., 1983; Brown and McLachlan, 2006). They are important integrators of the marine and terrestrial organic material present on the beach

Sandhoppers and beachfleas are a normal presence -even though endangered by touristic activities and beach management (see Ugolini and Ungherese 2011 for a revision)- in the damp zone of Mediterranean beaches. The sandhopper *T. saltator* and the beachflea *O. montagui* are common Amphipods throughout most of the Mediterranean basin (Bellan Santini et al., 1993). The biology and auto-ecology of talitrid Amphipods are sufficiently known, and the pan-Mediterranean sandhopper *T. saltator* has been the object of many studies. *T. saltator* digs temporary refuges a few centimetres below the surface of the damp belt of sandy beaches, whilst *O. montagui* and the other Mediterranean beachfleas are common in stranded material (*Posidonia* banquettes and algal deposits, see Wildish, 1988; Pavesi et al., 2007), independently from the substratum.

Environmental contamination of the supralittoral zone has received attention fairly recently; in fact many species of sandhoppers and beachfleas have been shown to be good biomonitors for some trace metals (see Marsden and Rainbow, 2004 for a review; see also Ugolini et al., 2004, 2005, 2008; Ungherese et al., 2010).

Owing to the hydrophobic character of PAHs, their concentration in water is normally very low (Lin et al., 1994), so they are difficult to detect. Large water volumes are needed for analysis, and their hydrophobicity/lipophilicity results in preferential partitioning into sediments (Lin et al., 1994). Analysis of sediments is equally difficult and prolonged. Therefore, it is known that to evaluate exposure to contaminants more accurately, it is important to detect them in the organisms. One of the factors which could influence the PAHs environmental availability and the concentration of these contaminants in animals could be the season, it is important, therefore, to be aware of, and if necessary allow for, seasonal changes in accumulated concentrations.

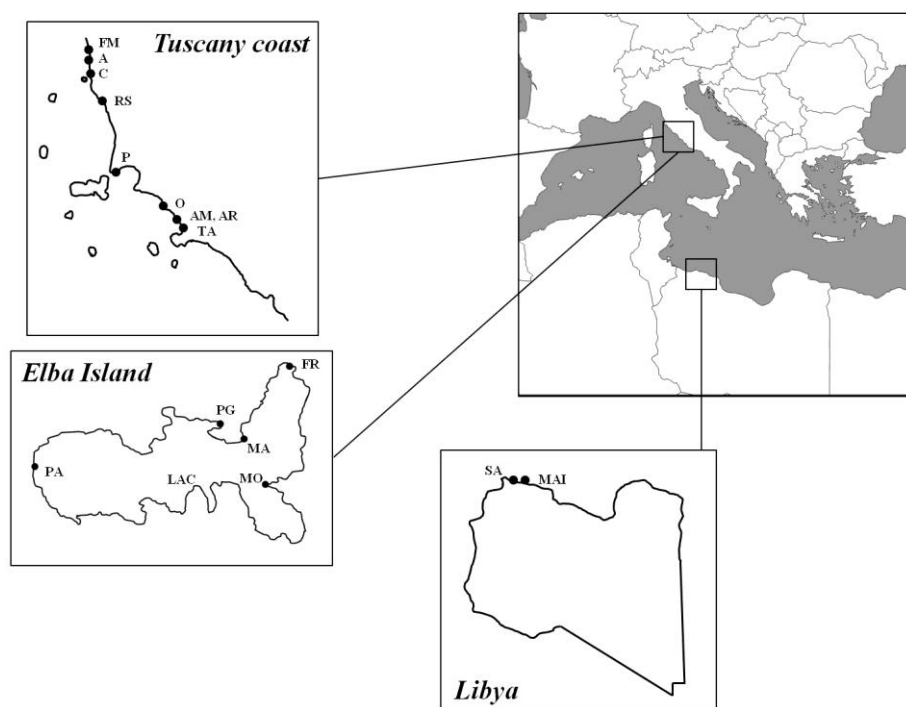


The aim of this study is to assess the possibility to use the pan-Mediterranean Amphipods *T. saltator* (sandhopper) and *O. montagui* (beachflea) as bioindicators of PAHs contamination and to evaluate the possibility that the seasonal changes in these organic compounds availability in the supralittoral zone may affect the concentration of PAHs in sandhoppers and beachfleas living on supralittoral soft and hard substrata.

## 2. MATERIALS AND METHODS

For the analysis of PAHs, we used adult individuals of *Talitrus saltator* and *Orchestia montagui* (except for ovigerous females). Sandhoppers and sand were collected at 8 localities along the Tuscany coast (Italy) in two different seasons: summer (2008-2010) and winter (2009). Albegna River summer samplings were performed in 2009 and 2010, and the winter samplings at Morto Vecchio River mouth were carried on 2008 and 2009. Beachfleas and stranded *Posidonia oceanica* were collected at 8 sites on the Tuscan (6) and Libyan (2) shores in summer 2008-2010, except for the localities of Portoferraio-Grigolo, Mola-Porto Azzurro (both located in the Elba island, Livorno, Italy), Sabratha and Maitiga (Tripoli, Libya) where samples were collected in summer 2008. The winter samplings were performed in 4 localities: Patresi and Magazzini in March 2008-2009, Cavo-Frugoso and Mola-Porto Azzurro in March 2009 (Fig.1). The latter localities are all located in the Elba island.

- FM, Morto Vecchio River mouth (Pisa, Italy) (*T. saltator*)
- A, Arno River mouth (Pisa, Italy) (*T. saltator*)
- C, Calambrone (Livorno, Italy) (*T. saltator*)
- RS, Rosignano Solvay (Livorno, Italy) (*T. saltator*)
- P, Piombino (Livorno, Italy) (*T. saltator*)
- O, Ombrone River mouth (Grosseto, Italy) (*T. saltator*)
- AR, Albegna River mouth (Grosseto, Italy) (*T. saltator*)
- AM, Albegna seashore (Grosseto, Italy) (*T. saltator*)
- TA, Talamone (Grosseto, Italy) (*O. montagui*)
- PA, Patresi (Elba island, Livorno, Italy) (*O. montagui*)
- PG, Portoferraio-Grigolo (Elba island, Livorno, Italy) (*O. montagui*)
- MA, Magazzini (Elba island, Livorno, Italy) (*O. montagui*)
- FR, Cavo-Frugoso (Elba island, Livorno, Italy) (*O. montagui*)
- MO, Mola-Porto Azzurro (Elba island, Livorno, Italy) (*O. montagui*)
- SA, Sabratha (Tripoli, Libya) (*O. montagui*)
- MAI, Maitiga (Tripoli, Libya) (*O. montagui*)



**Fig. 1** Location of the sampling sites along the shores of Tuscany, Elba Island and Libya. See text for further explanations.

After collection, the samples were frozen, dehydrated and then freeze-dried. Analyses were carried out according to the US-EPA method 3545B (1996), an extraction procedure for semi-volatile compound with Accelerated Solvent Extractor (Dionex mod. ASE 200). The extract were evaporated under nitrogen flow and brought to a final volume of 1 ml by addition of acetonitrile.

The 16 most toxic PAHs listed by the EPA (Environmental Protection Agency) were determined and quantified using HPLC (High Performance Liquid Chromatography) with a UV detector (Waters® PDA 996) and a Waters® 474 Scanning Fluorescence Detector (U.S. EPA, 2003).

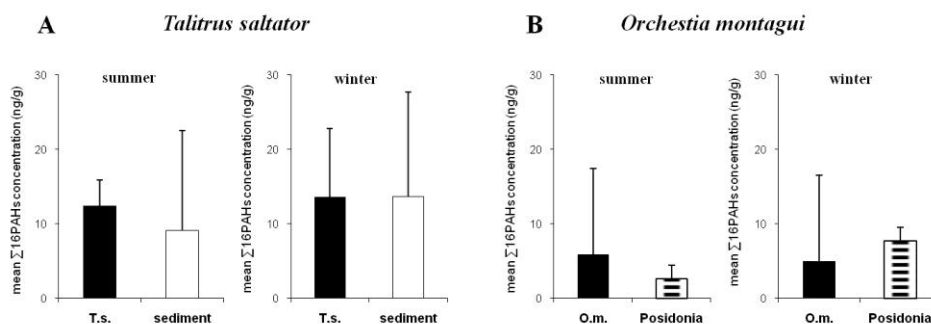
For data analysis, when the concentrations of PAHs were under detection limits, we calculate them as zero.

We evaluated the relationship between PAHs concentration in Amphipods and sand or stranded leaves of *P. oceanica* by the Spearman rank-order correlation coefficient test (Siegel and Castellan, 1989). We used the t-student test and Mann-Whitney test (Zar, 1984) to evaluate possible seasonal differences in total PAHs concentration in *T. saltator* and *O. montagui*.

### 3. RESULTS

#### *PAHs concentration in Amphipods, sand and stranded *P. oceanica**

The correlation between each of the 16 PAHs concentrations in *T. saltator* and sand did not reach the statistical significance for any PAHs analyzed both in summer and winter (Spearman rank-order correlation coefficient test,  $r_s$  max=0.586,  $n=8$ ,  $p=NS$ ) except for Fluoranthene in summer (Spearman rank-order correlation coefficient test,  $r_s$  =0.760,  $n=8$ ,  $p=0.028$ ). It was not possible to compare PAHs contents between *O. montagui* and stranded *P. oceanica* because of a large number of data under detection limits of the instrument used in this study.



**Fig.2** Mean  $\Sigma 16$  PAHs concentration (ng/g dry weight) in *T. saltator* and sediment (A), *O. montagui* and stranded *P. oceanica* (B) in summer and winter. Black bars, amphipods; white bars, sediment; striped bars, stranded *P. oceanica*.

Although the  $\Sigma 16$  PAHs concentration in *T. saltator* is higher than that in *O. montagui* (Fig.2) both in summer and in winter, there is not statistical difference comparing the total PAHs concentrations in sandhoppers and beachfleas (summer:  $U=15$ ,  $N_{Ts}=8$ ,  $N_{Om}=8$ ,  $p=NS$ ; winter:  $U=14$ ,  $N_{Ts}=5$ ,  $N_{Om}=4$ ,  $p=NS$ . U Mann-Whitney test). Moreover, the concentrations of PAHs in *T. saltator* did not show any difference between the two sampling seasons as well as in *O. montagui* (*T. saltator*:  $U=13$ ,  $N_{sum}=8$ ,  $N_{wint}=5$ ,  $p=NS$ ; *O. montagui*:  $U=15.5$ ,  $N_{sum}=8$ ,  $N_{wint}=4$ ,  $p=NS$ ; U Mann-Whitney test).

During the summer period sandhoppers collected at Morto Vecchio River mouth showed the highest values of Py (2.17 ng/g) and DBA (4.45 ng/g) compared with the concentrations in the other sampling sites (Tab.1A). The Fl (2.083 ng/g), Flu (1.053) and IP (1.16 ng/g) concentrations, instead, are higher in *T. saltator* collected at Calambrone with respect to the other localities, whilst the amphipods collected at Rosignano Solvay showed the highest values of

Chry (1.713 ng/g). Furthermore, sandhoppers showed the highest values of BbF (1.03 ng/g) and BghiP (2.41 ng/g) at the mouth of Arno River, BkF (1.306 ng/g) at Albegna seashore, Phe (1.184 ng/g), An (0.575 ng/g) and BaP (2.465 ng/g) at the near locality of Albegna River mouth. The concentration of A (3.723 ng/g) in *T. saltator* was detected only at Piombino sampling site (Tab.1A).

In winter, samples showing the highest Amphipods concentrations of Nap (2.15 ng/g) and BghiP (1.28) were detected at Morto Vecchio River mouth, A (1.096 ng/g) and BbF (0.262 ng/g) at Ombrone River mouth, whilst at Calambrone those of BkF (0.971 ng/g) and BaP (2.398 ng/g) (Tab.1B). The Acep concentration (0.484 ng/g) in *T. saltator* was detected only at Arno River

## A

PAHs in *T. saltator* and sand (ng/g dry weight) in summer

Location	Nap	Acep	A	Fl	Phe	An	Flu	Py	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	IP	Σ16 PAHs
FM	-	-	-	-	-	-	-	2,17	-	1,38	-	-	-	4,45	2,39	-	16,39
O	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	0,183
C	-	-	-	2,496	-	-	-	2,616	-	2,116	-	-	-	-	-	-	7,561
RS	-	-	0,83	2,083	0,863	0,42	1,053	2,14	-	1,08	-	-	-	-	-	1,16	8,8
P	-	-	-	0,156	0,136	0,106	0,113	0,185	0,145	0,149	0,171	0,308	-	-	-	-	2,573
A	-	-	-	0,893	0,416	1,04	-	-	-	1,713	-	-	-	-	-	-	4,063
AM	-	-	-	0,536	0,3	0,263	0,563	0,243	0,23	0,14	0,106	0,386	0,066	-	0,406	-	3,31
AR	-	-	3,723	0,38	0,35	0,166	0,366	0,216	0,2	0,363	0,256	0,393	0,33	-	0,31	0,206	7,266
	-	-	-	-	2,228	4,366	1,913	1,756	0,253	2,833	1,256	1,286	3,52	-	0,166	-	19,692
	-	-	-	0,06	0,846	0,19	0,033	2,136	0,05	1,073	1,03	0,566	0,114	-	2,41	0,123	8,674
	0,29	-	-	-	1,02	0,463	0,116	10,586	19,86	2,086	0,683	0,073	0,076	1,07	1,923	-	38,286
	-	-	-	-	0,08	0,183	0,103	0,1	0,126	0,11	0,93	1,306	0,05	-	-	-	2,99
	-	-	-	-	0,253	0,073	0,05	-	0,046	0,076	0,033	0,043	0,126	-	-	-	0,845
	-	-	-	-	1,184	0,575	-	-	-	1,44	0,585	0,58	2,465	0,505	-	-	7,529
	-	-	-	0,085	-	-	-	0,085	-	0,075	-	-	-	-	-	-	0,485

## B

PAHs in *T. saltator* and sand (ng/g dry weight) in winter

Location	Nap	Acep	A	Fl	Phe	An	Flu	Py	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	IP	Σ16 PAHs
FM	2,15	-	-	0,695	0,435	0,295	-	1,285	0,365	-	0,11	0,015	0,716	0,44	1,28	-	7,7805
O	0,195	-	-	0,641	-	0,365	0,461	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	1,723
C	-	-	1,096	0,467	0,241	0,241	0,585	1,235	-	0,583	0,262	-	0,499	0,922	0,971	-	7,102
RS	5,78	-	1,199	1,151	0,497	4,655	-	1,176	-	0,712	-	-	-	-	-	-	15,17
P	-	-	-	0,493	-	-	-	0,582	-	-	0,971	2,398	0,94	0,728	-	-	6,112
A	-	-	-	3,147	0,798	-	0,592	1,18	0,592	1,88	0,49	0,236	0,992	2,392	-	-	12,299
AM	-	-	0,919	3,001	9,864	4,636	1,468	3,412	-	2,169	-	-	-	-	-	-	24,741
AR	0,609	0,815	-	0,378	4,728	-	6,988	2,684	1,225	-	-	-	7,553	9,507	1,96	-	36,447
	0,787	0,484	-	2,895	0,468	2,734	1,669	3,412	2,77	0,579	0,238	-	1,001	2,361	0,777	2,422	22,597
	-	-	0,541	0,56	-	0,279	1,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,67

**Tab. 1** Mean concentration of 16 PAHs in *T. saltator* and sand collected at various sampling sites along the coasts of Tuscany and Elba Island (ng/g dry weight) in summer (A) and winter (B). The concentrations in Amphipods are in bold, the other values are the concentrations in sand. The framed values show the concentrations of PAHs which are higher in sandhoppers than in the sand. *Nap*, Naphthalene; *Acep*, Acenaphthylene; *A*, Acenaphthene; *Fl*, Fluorene; *Phe*, Phenanthrene; *An*, Anthracene; *Flu*, Fluoranthene; *Py*, Pyrene; *BaA*, Benzo[a]Anthracene; *Chry*, Chrysene; *BbF*, Benzo[b]Fluoranthene; *BkF*, Benzo[k]Fluoranthene; *BaP*, Benzo[a]Pyrene; *DBA*, Dibenz[a,h]Anthracene; *BghiP*, Benzo[g,h,i]Perylene; *IP*, Indeno[1,2,3-cd]Pyrene, Σ16PAHs, sum of the 16 PAHs analyzed.

mouth where sandhoppers showed the highest concentrations of Flu (1.669 ng/g). At Piombino and Arno River mouth we recorded the highest Py concentration in sandhoppers (3.412 ng/g); at Piombino were also reported high sandhoppers concentrations of Fl (3.001 ng/g), Phe (9.864 ng/g), An (4.636 ng/g) and Chry (2.169 ng/g).

In Tables 2A and B are reported, for each sampling site, the number of PAHs whose concentrations are higher in *T. saltator* than in sand, in summer and winter. In winter, more PAHs are accumulated by sandhoppers with respect to summer, except for the locality Calambrone. Moreover, in summer sandhoppers PAHs concentrations differed in relation to the number of aromatic rings in the order 4>3>5>6>2 (Tab.2A) whilst in winter the order is 5>3=4>6>2 (Tab.2B).

A						
Location	<i>T.s.</i> >Sediment	Aromatic rings				
		2	3	4	5	6
FM	4	0	0	2	1	1
O	2	0	0	1	0	1
C	7	0	3	3	0	1
RS	4	0	2	2	0	0
P	4	0	2	0	0	2
A	6	0	1	0	3	2
AM	7	0	1	4	2	0
AR	7	0	2	1	4	0
<i>Tot</i>		0	11	13	10	7

B						
Location	<i>T.s.</i> >Sediment	Aromatic rings				
		2	3	4	5	6
FM	10	1	2	2	4	1
O	6	0	0	2	3	1
C	3	0	0	0	2	1
P	6	0	4	2	0	0
A	14	1	4	4	3	2
<i>Tot</i>		2	10	10	12	5

**Tab. 2** Number of PAHs accumulated by *T. saltator*. A, summer samplings; B, winter samplings; *T.s.* > sediment, number of aromatic compounds whose concentration in Amphipods is higher than that in the sand. The number of PAHs accumulated by sandhoppers (*T.s.* > sediment) are divided for aromatic rings of the contaminants. For further explanations see text.

In *O. montagui* The summer concentrations of Fl (0.21 ng/g) at Mola-Porto Azzurro, DBA at Portoferraio-Grigolo (2.36 ng/g) and BkF (0.02 ng/g) at Maitiga were higher than those in beachfleas of the other localities (Tab.3A). Furthermore, the beachfleas collected at Sabratha showed the highest concentrations of Phe (5.74 ng/g), An (1.78 ng/g), Flu (7.22 ng/g), Py (6.29 ng/g), BaA (8.39 ng/g), Chry (1.49 ng/g), BbF (1.15 ng/g) and BaP (1.92 ng/g) with respect to the concentrations of the animals and stranded *P. oceanica* collected in the other sampling sites (Tab.3A).

In winter period the highest *O. montagui* concentration of Fl (1.292 ng/g) was detected at Mola-Porto Azzurro, the concentrations of Phe (2.452 ng/g), Flu (1.11 ng/g), Py (2.32 ng/g) at Patresi and those of BaA (3.105 ng/g) BbF (2.595 ng/g), BaP (4.2) at Magazzini (Tab.3B).

In Tables 4 A and B are reported the number of PAHs whose concentrations are higher in *O. montagui* than in stranded *P. oceanica*. Results show that beachfleas can accumulate a greater number of PAHs in summer than in winter specially at Mola-Porto Azzurro, Talamone, Sabratha and Maitiga. Also for *O. montagui* PAHs concentrations differed in relation to the number of aromatic rings: in summer 4>5>3>6>2 (Tab.4A) and in winter 3=4>5>6=2 (Tab. 4B).

#### A

PAHs in *O. montagui* and stranded *P. oceanica* (ng/g dry weight) in summer

Location	Nap	Acep	A	Fl	Phe	An	Flu	Py	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	IP	Σ16 PAHs
PA	-	-	-	-	-	-	-	0,053	-	-	-	-	-	-	-	-	0,086
MA	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	0,19	-	-	-	-	-	-	0,37
FR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PG	-	-	-	0,383	-	0,076	-	-	-	-	0,1	-	0,33	-	-	-	0,33
MO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,36	-	-	0,563
TA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,36
SA	-	-	-	0,21	0,2	0,08	0,23	0,1	0,42	0,53	0,62	-	-	-	-	-	0
MAI	-	-	-	0,16	0,18	0,17	0,15	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	2,39
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8
	-	-	-	-	-	-	-	-	0,686	0,59	0,236	-	0,996	2,356	1,343	-	6,21
	-	-	1,09	0,793	-	-	-	0,8	-	-	0,163	0,163	0,69	1,636	-	-	5,335
	-	-	-	-	5,74	1,78	7,22	6,29	8,39	1,49	1,15	-	1,92	-	-	-	33,98
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	1,13	0,25	-	0,57	-	-	-	0,02	-	-	-	-	1,97
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### B

PAHs in *O. montagui* and stranded *P. oceanica* (ng/g dry weight) in winter

Location	Nap	Acep	A	Fl	Phe	An	Flu	Py	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	IP	Σ16 PAHs
PA	-	-	-	-	2,452	-	1,11	2,32	0,315	-	-	-	-	-	-	-	6,197
MA	-	-	-	-	-	-	2,045	-	4,09	-	0,98	-	1,96	-	-	-	9,07
FR	-	-	-	-	-	-	0,89	1,805	3,105	-	2,595	-	4,2	-	-	-	12,6
MO	-	-	-	-	-	-	3,995	4,015	-	3,17	-	-	5,325	-	-	0,332	16,837
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,038	-	1,038
	-	-	-	1,292	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,292
	-	0,607	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,607

**Tab. 3** Concentration of 16 PAHs in *O. montagui* and stranded *P. oceanica* collected at various sampling sites along the coasts of Elba Island and Libya (ng/g dry weight) in summer (A) and winter (B). For further explanations see Tab.1.

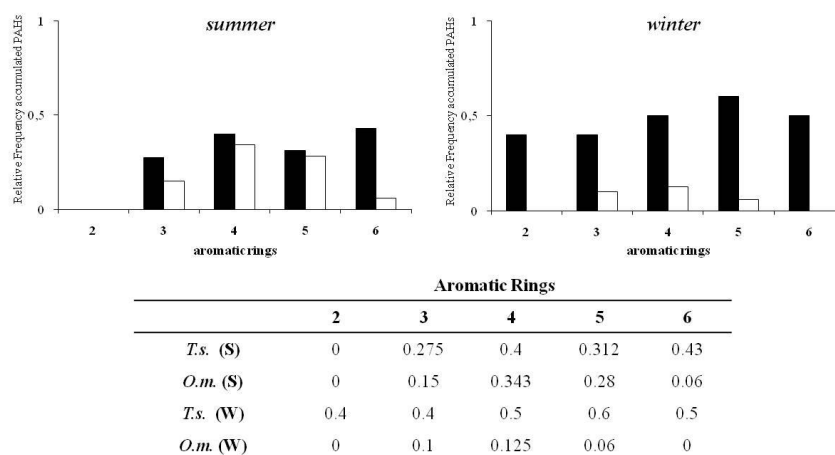
A						
Location	<i>O.m.&gt;Posidonia</i>	Aromatic rings				
		2	3	4	5	6
PA	1	0	0	1	0	0
MA	0	0	0	0	0	0
FR	1	0	0	0	1	0
PG	1	0	0	0	1	0
MO	6	0	2	3	1	0
TA	6	0	0	2	3	1
SA	8	0	2	4	2	0
MAI	4	0	2	1	1	0
Tot		0	6	11	9	1

B						
Location	<i>O.m.&gt;Posidonia</i>	Aromatic rings				
		2	3	4	5	6
PA	2	0	1	1	0	0
MA	2	0	0	1	1	0
FR	0	0	0	0	0	0
MO	1	0	1	0	0	0
Tot		0	2	2	1	0

**Tab. 4** Number of PAHs accumulated by *O. montagui* in summer (A) and winter (B); *O.m. > Posidonia*, number of aromatic compounds whose concentration in Amphipods is higher than that in the stranded *Posidonia*. For further explanations see Tab.2.

The comparison between the number of PAHs accumulated by sandhoppers and beachfleas (Fig.3) showed that *T. saltator* could accumulate a greater number of PAHs, in summer and winter, with respect to *O. montagui*, in all the aromatic groups (winter: n=5, x=0, p<0.05. Sign test).



**Fig.3** Number of accumulated PAHs (expressed as Relative Frequency), divided for the number of aromatic rings, in *T. saltator* (black bars) and *O. montagui* (white bars) in the two sampling season. In the table below the graphs are reported the Relative Frequencies of accumulated PAHs in the Amphipod during summer (S) and winter (W).

### Sources of PAHs

With the development of environmental geochemistry, the pyrolytic or petrogenic source of contamination could be assessed by means of several molecular ratios (Sicre et al., 1987; Budzinski et al., 1997; Baumard et al., 1998). These criteria are based on peculiarities in PAH composition and distribution pattern as a function of the emission source. Pyrolytic aromatic hydrocarbons are characterised by the occurrence of PAHs of a wide range of molecular weights, while petroleum hydrocarbons are dominated by the lowest molecular weight PAHs (Baumard et al., 1999). A petrogenic source of contamination is suggested by high Phenanthrene/Anthracene ratios ( $>15$ ), in fact petroleum contains more Phenanthrene relative to Anthracene, on the contrary pyrolysis of organic matter at very high temperature generates PAHs characterised by a low Phe/An ratio ( $<10$ ) (Gschwend et al., 1981; Sicre et al., 1987; Budzinski et al., 1997; Gui-Peng, 2000; Soclo et al., 2000; Magi et al., 2002).

The ratios Fluoranthene/Pyrene (Gschwend et al., 1981; Sicre et al., 1987; Colombo et al., 1989; Magi et al., 2002) could be used as additional tools to distinguish PAHs origins: a predominance of Fluoranthene over Pyrene (Flu/Py  $>1$ ) is characteristic of pyrolytic products, while in petroleum-derived PAHs, Pyrene is more abundant than Fluoranthene (Flu/Py  $<1$ ) (Budzinski et al., 1997).

When the PAHs concentrations were above detection limits and was possible to calculate molecular ratios (Tabs. 5 and 6), results showed that the ratio Phe/An was  $<10$  for *T. saltator*, sand, *O. montagui* and stranded *P. oceanica* at all the sampling sites both in summer and in winter. In summer the ratio Flu/Py was  $>1$  for sandhoppers and sand of Piombino, *T. saltator* collected at Albegna seashore and sediment from Rosignano Solvay, whilst in winter only for the sand of Piombino. The same ratio (Flu/Py), in summer, was  $>1$  for both samples of the locality Mola-Porto Azzurro and also for the beachfleas of Sabratha. In winter, when PAHs concentrations were above detection limits, Flu/Py was  $<1$  for the samples of beachfleas and stranded *P. oceanica*, for sandhoppers of Ombrone River, Piombino and Arno River and finally also for Calambrone sand.



**A**

		Phe/An	Flu/Py
<b>FM</b>	<i>T.s.</i>	-	-
	sand	-	-
<b>O</b>	<i>T.s.</i>	-	-
	sand	-	-
<b>C</b>	<i>T.s.</i>	<b>2,05</b>	<b>0,49</b>
	sand	1,28	0,61
<b>RS</b>	<i>T.s.</i>	<b>2,15</b>	-
	sand	1,14	2,32
<b>P</b>	<i>T.s.</i>	<b>2,11</b>	<b>1,69</b>
	sand	0,51	1,09
<b>A</b>	<i>T.s.</i>	<b>4,45</b>	<b>0,02</b>
	sand	2,20	0,01
<b>AM</b>	<i>T.s.</i>	<b>0,44</b>	<b>1,03</b>
	sand	3,47	-
<b>AR</b>	<i>T.s.</i>	<b>2,06</b>	-
	sand	-	-

**B**

		Phe/An	Flu/Py
<b>FM</b>	<i>T.s.</i>	<b>1,47</b>	-
	sand	-	-
<b>O</b>	<i>T.s.</i>	<b>1</b>	<b>0,47</b>
	sand	0,10	-
<b>C</b>	<i>T.s.</i>	-	-
	sand	-	0,50
<b>P</b>	<i>T.s.</i>	<b>2,13</b>	<b>0,43</b>
	sand	-	2,60
<b>A</b>	<i>T.s.</i>	<b>0,17</b>	<b>0,49</b>
	sand	-	-

**Tab. 5** Molecular ratios of sand and *T. saltator* samples at the various sampling sites in summer (A) and winter (B). Phe, Phenanthrene; An, Anthracene; Flu, Fluoranthene; Py, Pyrene.

**A**

		Phe/An	Flu/Py
<b>PA</b>	<i>O.m.</i>	-	-
	stranded	-	-
<b>MA</b>	<i>O.m.</i>	-	-
	stranded	-	-
<b>FR</b>	<i>O.m.</i>	-	-
	stranded	-	-
<b>PG</b>	<i>O.m.</i>	-	-
	stranded	-	-
<b>MO</b>	<i>O.m.</i>	<b>2,50</b>	<b>2,30</b>
	stranded	1,06	1,07
<b>TA</b>	<i>O.m.</i>	-	-
	stranded	-	-
<b>SA</b>	<i>O.m.</i>	<b>3,22</b>	<b>1,15</b>
	stranded	-	-
<b>MAI</b>	<i>O.m.</i>	<b>4,52</b>	-
	stranded	-	-

**B**

		Phe/An	Flu/Py
<b>PA</b>	<i>O.m.</i>	-	<b>0,47</b>
	stranded	-	-
<b>MA</b>	<i>O.m.</i>	-	<b>0,49</b>
	stranded	-	0,99
<b>FR</b>	<i>O.m.</i>	-	-
	stranded	-	-
<b>MO</b>	<i>O.m.</i>	-	-
	stranded	-	-

**Tab. 6** Molecular ratios of stranded *P. oceanica* and *O. montagui* samples at the various sampling sites in summer (A) and winter (B). For further explanations see Tab.5.

#### 4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The PAHs analysis showed that *T. saltator* can accumulate all the contaminants analyzed, whilst *O. montagui* 12 out of 16 PAHs.

The concentrations of total PAHs both in the sand and in *T. saltator* were generally a little bit higher than those recorded in the stranded *P. oceanica* and *O. montagui* in summer and winter. The beachfleas collected at Sabratha showed the highest values of PAHs concentration, whilst at Piombino and Arno River mouth were recorded the highest PAHs concentrations for sandhoppers. We can also notice that *T. saltator* can accumulate more aromatic compounds than *O. montagui* and, comparing the two sampling season, sandhoppers accumulate more PAHs in winter, probably due to the longer exposition of the animals to the source of contamination. Despite the most intensive summer degradation of these aromatic hydrocarbons due to the direct action of sun radiation and UV-rays, beachfleas can accumulate a greater number of PAHs in summer than in winter.

Moreover, the PAHs analysis showed that sandhoppers can accumulate PAHs of all the aromatic groups, even those with high molecular weight (penta- and hexa-aromatics), instead beachfleas, like some other crustaceans (Baumard et al., 1998), accumulates tri-, tetra- and penta-aromatics polycyclic aromatic hydrocarbons.

The great variability between sandhoppers and beachfleas PAHs accumulation, but also among localities within the same species, is undeniable and make difficult a generalization, even if these differences could be related to the autoecology of these Amphipods and their diet, in fact they feed on plants and animal organic matter of marine and terrestrial origin. Moreover, *T. saltator* are present on sandy beaches with medium and fine grain size and scarce presence of stranded vegetables (Ugolini et al., 1995), whilst *O. montagui* can live in *Posidonia oceanica* banquettes formed on sandy or stony beaches or directly on hard substrata, in fact their presence is often related to the *Posidonia* banquettes or other stranded vegetables (macroalgae).

We can also underline the existence sampling site differences. In particular, at the localities of Albegna River, Piombino, Morto Vecchio and Arno River, for *T. saltator*, Talamone, Mola-Porto Azzurro, Magazzini and Libyan sampling sites, for *O. montagui*, were recorded the highest concentrations of PAHs in the animals, probably due to the near harbours and factories (Piombino, Mola-Porto Azzurro, Portoferraio), airport and refinery (Libyan localities) or river estuaries (Albegna and Arno Rivers). The locality of Morto Vecchio, instead, is situated in the Regional Park of Migliarino-San Rossore-Massaciuccoli, otherwise this site is close to the Arno River mouth and on the beach is always present a great amount of stranded material of marine and terrestrial origin, these characteristics could explain the high concentrations of PAHs in sandhoppers from this area.

The molecular ratios suggest a pyrolytic source of the contamination for the samples collected at Morto Vecchio, Rosignano Solvay, Albegna River and seashore, Mola-Porto Azzurro on the Tuscan shore, Sabratha and Maitiga in Libya. The source of contamination could be of petrogenic origin at Patresi and Magazzini (Elba Island), whereas at Arno River mouth, Calambrone and Piombino there is probably a mixed cause of contamination, in fact the ratios suggest both pyrolytic and petrogenic source

Despite the necessity of further studies to broaden the knowledge of PAHs bioaccumulation in sandhoppers and beachfleas, in particular correlating the concentration of these aromatic compounds in the Amphipods with their lipids content, *O. montagui* and specially *T. saltator* appear to be good bioconcentrators of this class of organic compounds. The widespread *T. saltator*, which could accumulate all the examined PAHs, more than *O. montagui*, could be used as bioindicator of PAHs pollution of the supralittoral environment.

Finally, being aware of seasonal variation of PAHs bioavailability, using Amphipods as PAHs bioaccumulators it should be necessary to consider season and temperature as factors which affect the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in these animals.

#### Acknowledgements

The research was funded by the Fondazione Monte dei Paschi (Siena) (grant 31017 assigned to A. Ugolini). We wish to thank the Ente Parco Regionale di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa) and the Ente Parco Nazionale dell'Arcipelago Toscano, for the permission of sampling; and the Centro Interuniversitario di Biologia Marina (CIBM, Livorno) for some facilities.

## 5. REFERENCES

- Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skare, J.U. & Goksoyr, A. 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, **36**, 75–98.
- Beyer, J., Aas, E., Borgenvik, H.K. & Ravn, P. 1998. Bioavailability of PAH in Effluent water from an aluminium works evaluated by transplant caging and biliary fluorescence measurements of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Marine Environmental Research*, **46** (1–5), 233–236.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T. & Belloq, J. 1998. Concentration of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 951–960.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H. & Hansen, P. D. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research*, **47**(1), 17–47.
- Bellan Santini, D., Karaman, G., Krapp Schickel, G., Ledoyer, M. & Ruffo, S. 1993. The Amphipoda of the Mediterranean. Part 3. Gammaridea, Ingolfiellidea, Caprellidea. *Mémoires de l'Institut océanographique*, **13**, 577–813. Monaco.
- Brown, A.C. & McLachlan, A. 2006. *Ecology of Sandy Shores*. Elsevier, Amsterdam.
- Budzinski, H., Jones, I., Belloq, J., Pierrad, C. & Garrigues, P. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry*, **58**, 85–97.
- Colombo, J.C., Pelletier, E., Brochu, C., Khalil, M. & Catoggio, J.A. 1989. Determination of hydrocarbon sources using *n*-alkanes and polycyclic aromatic distribution indexes. Case study: Rio de la Plata, Argentina, *Environmental Science and Technology*, **23**, 888–894.
- Griffiths, C.L., Stenton-Dozey, J.M.E. & Koop, K. 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. in: McLachlan, A. and Erasmus, T. (Eds.), *Sandy Beaches as Ecosystems*, 547–556. W. Junk Publishers, The Hague, Netherlands.
- Gschwend, P.M. & Hites, R.A. 1981. Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the North-eastern US. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **45**, 2359–2367.
- Gui-Peng, Y. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China Sea. *Environmental Pollution*, **108**, 163–171.
- Legambiente, 2007. L'inquinamento da idrocarburi nel Mar Mediterraneo. Dossier, 1–10.

- Lehr, R.E. & Jerina, D.M.** 1977. Metabolic activation of polycyclic hydrocarbons. *Archives of Toxicology*, **39**, 1–6.
- Lin, E.L.C., Cormier, S.C. & Racine, R.N.** 1994. Synchronous fluorometric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13** (5), 707–715.
- Magi, E., Bianco, R., Ianni, C. & Di Carro, M.** 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environmental Pollution*, **119**, 91–98.
- Marsden, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology – the amphipod example?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373–408.
- McElroy, A. E., Farrington, J. W. & Teal, J. M.** 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment* (Varanasi, U., ed.). CRC press, Boca Raton, FL, pp. 1–40.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L. & Varanasi, U.** 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews. Environ. Contam. Toxicology*, **143**, 79–165.
- Naes, K., Knutzen, J. & Berglund, L.** 1995. Occurrence of PAH in marine organisms and sediments from smelter discharge in Norway. *Science of the Total Environment*, **163**, 93–106.
- Pavesi, L., Iannilli, V., Zarattini, P. & De Matthaeis, E.** 2007. Temporal and spatial distribution of three supralittoral species on a sandy beach of central Italy. *Marine Biology*, **151**, 1585–1595.
- Rost, H., Loibner, A.P., Hasinger, M., Braun, R. & Szolar, O.H.J.** 2002. Behavior of PAHs during cold storage of historically contaminated soil samples. *Chemosphere*, **49**, 1239–1246.
- Sanz-Lázaro, C., Marin, A. & Borredat, M.** 2008. Toxicity studies of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on European Amphipods. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **18**, 323–327.
- Sicre, M.A., Marty, J.C., Saliot, A., Aparicio, X., Grimalt, J. & Albaiges J.** 1987. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: occurrence and origin. *Atmospheric Environment*, **21**, 2247–2259.
- Siegel, S. & Castellan Jr, J.N.** 1989. Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences, 2<sup>nd</sup> Ed. McGraw Hill, New York.
- Soclo, H.H., Garrigues, P. & Ewald, M.** 2000. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, **40**, 387–396.
- Ugolini, A. & Ungherese, G.** 2011. Sandhoppers as bioindicators of anthropogenic influence on Mediterranean sandy beaches. In: *Life in the*

*Mediterranean sea: a look at habitat changes*. (Ed. N. Stambler), Nova Science Publishers Inc., in press.

- Ugolini, A., Felicioni, S., Ruffo, S. & Cipriani, L.** 1995. Distribution of *Talorchestia ugoi* and other sandhoppers in Corsica. *Italian Journal of Zoology*, **62**, 291—296.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of the heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhoppers species: *Talitrus saltator* Montagu and *Talorchestia ugoi* Bellan Santini and Ruffo. *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaporti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349-357.
- Ungherese, G., Baroni, D., Focardi, S. & Ugolini, A.** 2010. Trace metal contamination of Tuscan and eastern Corsican coastal supralittoral zones: the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) as a biomonitor. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73** (8), 1919-1924.
- Uthe, J.F. & Musial, C.J.** 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of American lobster (*Homarus americanus*), in the proximity of a coal coking plant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **37** (5), 730–738.
- Wildish, D.J.** 1988. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology*, **66** (11), 2340-2359.
- Zar, J.H.** 1984. Biostatistical Analysis. 2<sup>nd</sup> ed Prentice-Hall, New Jersey.

# CAPITOLO 8

## **Bioaccumulo di metalli in traccia e idrocarburi policiclici aromatici in tre specie di anfipodi sopralitorali**

---

I risultati presentati nel seguente capitolo sono stati ottenuti in collaborazione con la il Dott. G. Perra (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena), il Dott. D. Baroni (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena) e il Prof. A. Ugolini.





## 1. INTRODUZIONE

La fascia del sopralitorale, zona di notevole importanza ecologica in quanto ambiente di transizione tra l'ecosistema marino e quello terrestre, è soggetta a numerose fonti di contaminazione di varia origine, sia naturale che antropica.

La presenza di metalli in traccia e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nelle aree costiere rappresenta un problema sempre più discusso a causa della loro tossicità, persistenza, difficile biodegradabilità e la tendenza ad essere accumulati negli organismi (Lehr e Jerina, 1977; McElroy et al., 1989; Ikem e Egiebor, 2005).

Tra i numerosi organismi proposti come biomonitor della contaminazione ambientale, studi condotti su anfipodi talitridi delle coste del Mar Baltico, Mediterraneo e dell'Oceano Pacifico hanno dimostrato che questi crostacei sono buoni bioindicatori della contaminazione da metalli in traccia (Rainbow et al. 1989; Fialkowski et al. 2000, 2003; Ugolini et al. 2004, 2005, 2008; Marsden and Rainbow, 2004). In molti studi sono stati, inoltre, proposti bioindicatori della contaminazione da IPA in ambiente marino (Meador et al., 1995; Baumard et al., 1998), tuttavia il sopralitorale ha fino ad oggi ricevuto scarsa attenzione, anche se recenti ricerche su anfipodi europei hanno proposto questi crostacei come bioindicatori della contaminazione da questi idrocarburi (Sanz-Lázaro et al., 2008).

Gli anfipodi che vivono nella zona del sopralitorale, oltre a costituire la maggior componente in termini di biomassa di questo ambiente, svolgono un ruolo chiave dal punto di vista del flusso dell'energia che passa attraverso l'ecosistema, nutrendosi di materiale organico spiaggiato di origine sia marina che terrestre e costituiscono una fonte di cibo per numerose specie di coleotteri, pesci, uccelli ed anche mammiferi (Palluault, 1954; Griffith et al., 1983; Wildish, 1988; Bergerard, 1989). Gli anfipodi talitridi abitano la zona umida del sopralitorale di coste sabbiose e rocciose e la loro presenza può essere più o meno legata a quella di materiale vegetale spiaggiato, come le banquettes di *P. oceanica* (Marsden, 1991a,b; Prato et al., 1995; Ugolini et al., 1995).

Dati i numerosi studi presenti su *Talitrus saltator*, una delle più comuni specie europee di anfipodi sopralitorali, circa l'elevata capacità di bioaccumulo di metalli in traccia ed il possibile impiego di questi crostacei come biomonitor della contaminazione da metalli pesanti (Ugolini et al., 2004, 2005; Fialkowski et al., 2009), il presente lavoro si propone di valutare la capacità di bioaccumulo di metalli in traccia e idrocarburi policiclici aromatici in specie di anfipodi talitridi che presentano interesse a causa della loro distribuzione geografica: limitata (*Talorchestia ugonii*) o, viceversa, che occupano un ampio areale (*Deshayesorchestia deshayesii* e *Platorchestia platensis*).

## 2. MATERIALI E METODI

Individui adulti di *Talorchestia ugonii*, *Platorchestia platensis*, *Deshayesorchestia deshayesii*, sabbia e *Posidonia oceanica* spiaggiata sono stati raccolti in 12 località situate sulle coste della Corsica, della Libia, dell'isola d'Elba e della Toscana tra Maggio e Luglio 2008-2009 (Fig.1):

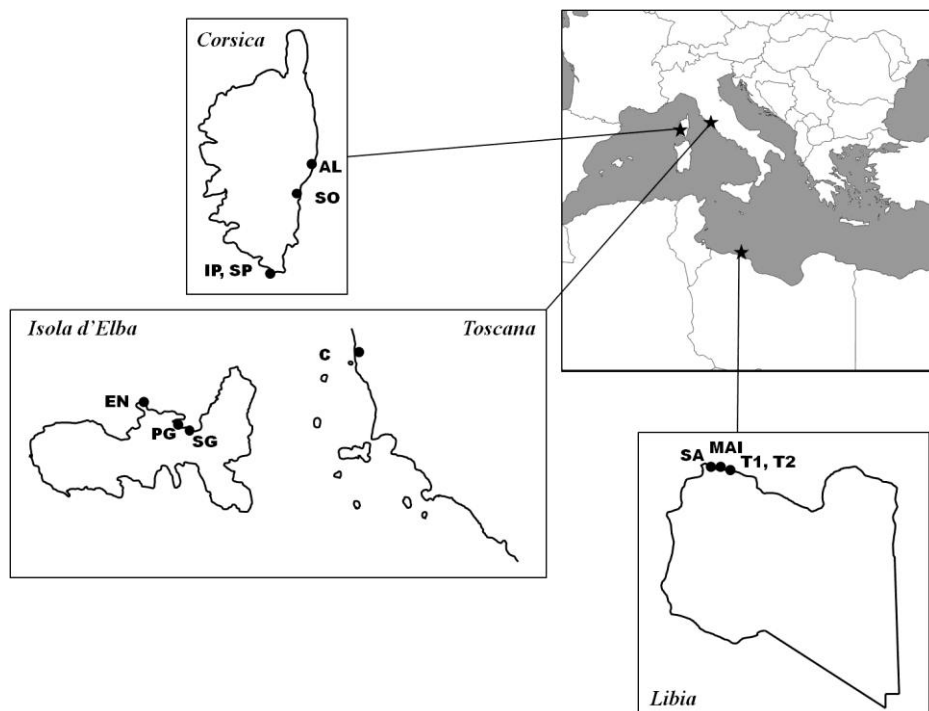
- Aleria (AL) *T. ugonii*
- Solaro (SO) *T. ugonii*
- Isola Piana (IP) *T. ugonii*
- Sperone Grande (SP) *D. deshayesii*
- Calambrone (C) *P. platensis*
- Enfolia (EN) *P. platensis*
- Portoferraio-Grigolo (PG) *P. platensis*
- San Giovanni (SG) *P. platensis*
- Sabratha (SA) *D. deshayesii*
- Maitiga (MAI) *D. deshayesii*
- Tripoli 1 (T1) *P. platensis*
- Tripoli 2 (T2) *P. platensis*

I campioni raccolti sono stati disidratati ad una temperatura di 25° C fino a raggiungere un peso secco costante. Circa 150 mg di ogni campione sono stati poi analizzati per determinare il contenuto di metalli in traccia e IPA.

Per ogni campione raccolto è stata analizzata la concentrazione dei seguenti metalli in traccia: Al, Fe, Zn, Cu, Cr, Hg, Pb, Cd, Mn, Ni, As e V. I campioni sono stati mineralizzati in 2 ml di HNO<sub>3</sub> e 0,5 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (t = 120°C, P = 2000-3000 KB).

Cd, Cr, Ni e Pb sono stati determinati tramite spettrometria ad assorbimento atomico in fornello di grafite (GF-AAS) mentre Al, Fe, Zn, Mn e Cu sono stati analizzati con lo spettrometro di emissione al plasma (ICP/EAS). Per determinare il contenuto di Hg è stata utilizzata la tecnica dei vapori freddi (FIMS, "Flow Injection Mercury System"). Infine, As e V sono stati determinati mediante l'utilizzo dell'ICP-AES Varian 720 attraverso il metodo dello standard interno.

La determinazione del contenuto di IPA è avvenuta secondo il metodo EPA 3545B (US EPA, 1996). I campioni disidratati sono stati estratti con ASE con una miscela di esano (30%) in diclorometano (70%). L'estratto è stato poi evaporato sotto flusso di azoto e portato a volume finale (0,5 ml) con acetonitrile. La determinazione qualitativa e quantitativa dei 16 IPA, ritenuti "contaminanti prioritari" dall'Environmental Protection Agency (EPA), è avvenuta mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) con rivelatore a serie di fotodiodi (Waters® PDA 996) e rivelatore a fluorescenza (Waters® 474 Scanning Fluorescence Detector) in serie.



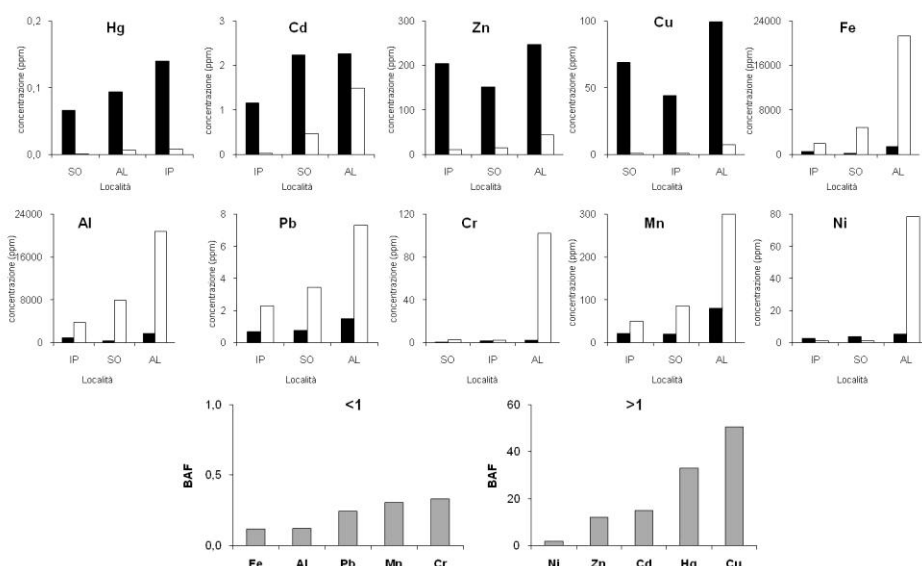
**Fig.1** Località di campionamento situate lungo le coste della Corsica, Toscana, Isola d'Elba e Libia. Per ulteriori informazioni vedi testo.

### 3. RISULTATI

Dall'analisi dei metalli in traccia è emerso che per *T. ugalinii* il Fattore di Bioaccumulo, BAF ( $C_b/C_s$ :  $C_b$ , concentrazione del metallo nel biota;  $C_s$ , concentrazione del metallo nel substrato), è  $> 1$  per Hg, Cd, Zn, Cu, Ni ed inoltre la concentrazione di Hg, Cd, Zn, Cu negli anfipodi è ampiamente superiore rispetto a quella rilevata nella sabbia in tutte le località di campionamento, mentre per il Ni in due siti su tre (Fig.2).

La concentrazione di Hg, Zn e Cu in *P. platensis* è sempre maggiore di quella registrata nella *P. oceanica* spiaggiata ( $n=6$ ,  $x=0$ ,  $p<0.05$ . Sign test), mentre il Cd risulta maggiormente concentrato negli animali in cinque località su sei. Per la platorchestia il valore del BAF risulta superiore all'unità oltre che per i metalli sopramenzionati anche per Ni e Fe (Fig.3).

In *D. deshayesii* la concentrazione di sei metalli (Hg, Cd, Zn, Cu, As, Ni) risulta maggiore rispetto a quella rilevata nel sedimento e per gli stessi metalli il BAF è  $>1$  (Fig.4).



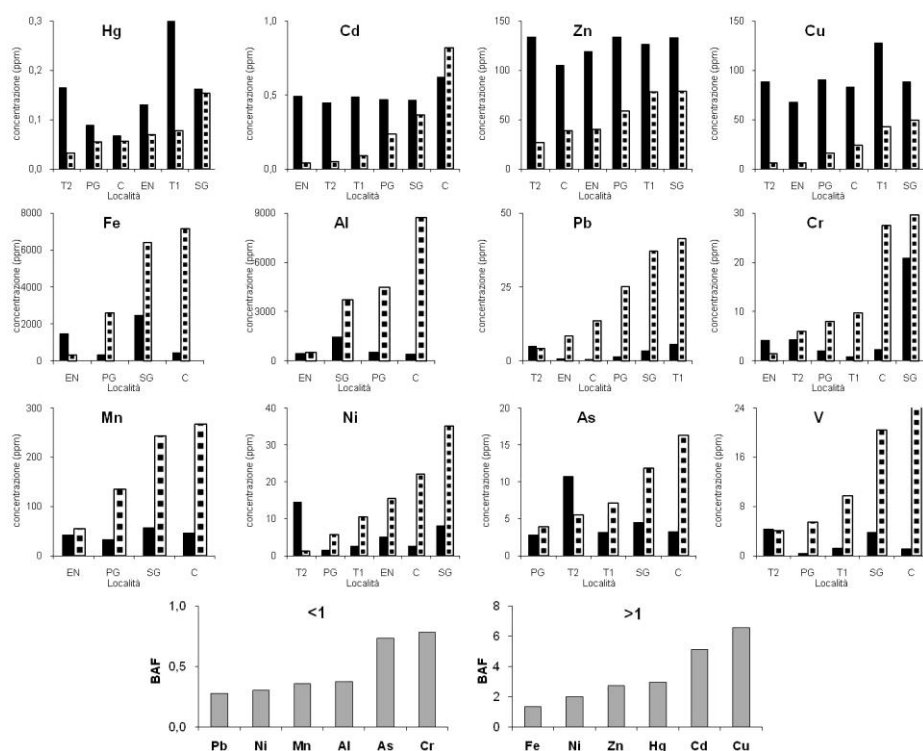
**Fig.2** Concentrazione dei metalli in traccia in *T. ugolinii* (barre nere) e nella sabbia (barre bianche) espressa in ppm. Nei grafici in basso è riportato il Fattore di Bioaccumulo (BAF) per i metalli analizzati, divisi per valori <1 e >1. Si veda il testo per ulteriori spiegazioni.

I risultati delle analisi del contenuto di idrocarburi policiclici aromatici mostrano che solo in *P. platensis* il valore del Fattore di Bioaccumulo supera l'unità, in particolare per gli IPA con  $\leq 3$  anelli aromatici e quelli penta-aromatici, mentre i valori del BAF per le altre due specie risultano sempre <1 (Fig.5).

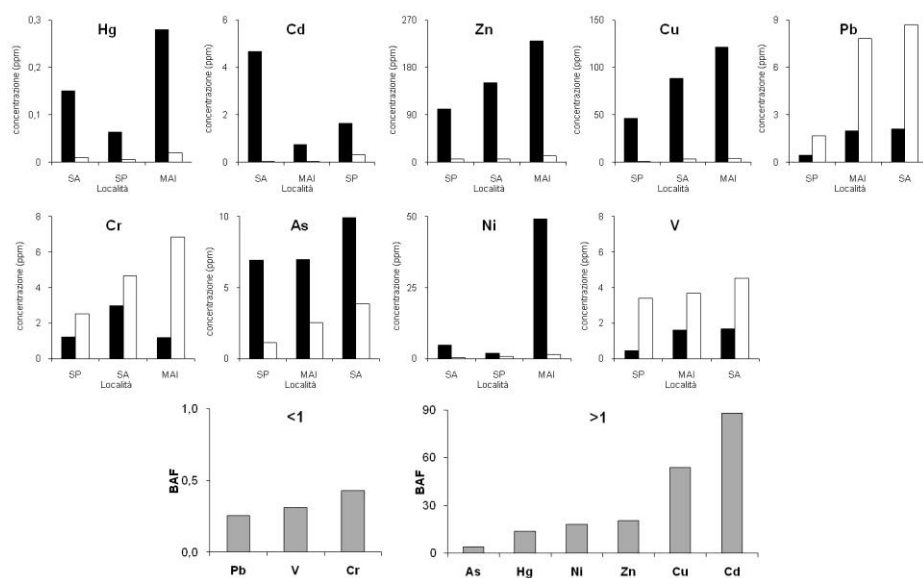
#### 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ricerche condotte sul bioaccumulo di metalli in traccia di *T. ugolinii* hanno mostrato come questi anfipodi siano in grado di accumulare Hg, Cd, Zn e Cu (Ugolini et al., 2005) ed i risultati ottenuti nel presente lavoro confermano questi dati, nonostante l'esiguo numero di località di campionamento.

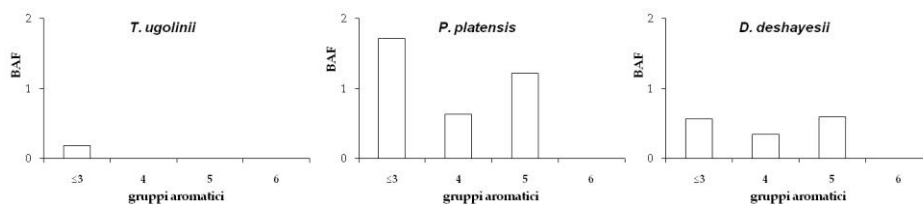
*P. platensis* si conferma come buon bioindicatore della contaminazione da Cu e Zn (Rainbow, 1992; Weeks, 1992) e risulta inoltre in grado di accumulare Hg e probabilmente anche Cd. Per quanto riguarda Fe e Ni, i valori del BAF > 1 sono dovuti alle alte concentrazioni rilevate negli anfipodi a Enfole (Fe) e Tripoli (Ni), mentre nelle altre località di campionamento la concentrazione di questi metalli è risultata sempre maggiore nella *P. oceanica* spiaggiata.



**Fig.3** Concentrazione dei metalli in traccia in *P. platensis* (barre nere) e *P. oceanica* spiaggiata (barre a strisce) espressa in ppm. Per ulteriori informazioni si veda Fig.2.



**Fig.4** Concentrazione dei metalli in traccia in *D. deshayesii* (barre nere) e nella sabbia (barre bianche) espressa in ppm. Per ulteriori spiegazioni si veda Fig.2.



**Fig.5** Fattore di Bioaccumulo (BAF) degli IPA divisi per gruppi aromatici ( $\leq 3$ , 4, 5 e 6 anelli aromatici) in *T. ugalinii*, *P. platensis* e *D. deshayesii*.

Nonostante le sole tre località di raccolta dei campioni, *D. deshayesii* sembra in grado di accumulare Hg, Cd, Zn, Cu, As e Ni, le cui concentrazioni negli animali sono risultate sempre maggiori rispetto a quelle nel sedimento e per gli stessi metalli il Fattore di Bioaccumulo ha mostrato valori superiori all'unità.

Per quanto riguarda gli idrocarburi aromatici, delle tre specie prese in esame solo *P. platensis* riesce ad accumulare questi contaminanti organici, in particolare quelli a più basso peso molecolare, con 2 o 3 anelli aromatici, come avviene in altri crostacei (Baumard et al, 1998). I valori del BAF per *T. ugalinii* e *D. deshayesii*, invece, non sono mai maggiori di 1, in nessun gruppo di aromaticità. Tuttavia, dato lo scarso numero di località di campionamento, per escludere la capacità di accumulare IPA da parte di questi anfipodi dovrebbero essere condotte ulteriori ricerche.

Le tre specie di anfipodi sopralitorali esaminate in questo lavoro si configurano pertanto come potenziali biomonitor della contaminazione da metalli in traccia dei litorali sabbiosi e rocciosi.

## 5 BIBLIOGRAFIA

- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T. & Belloq, J.**, 1998. Concentration of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 951-960.
- Bergerard, J.** 1989. Ecologie des laisses de marée. *L'année Biologique*, **28** (1), 39-54.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183-192.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Zmudzinski, L.** 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 81-93.
- Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Špegys, M. & Rainbow, P.S.** 2009. The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as biomonitor of trace metals bioavailability in European coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **58**, 39-44.
- Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K.** 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (McLachlan, A. and Erasmus, T. Eds.), pp. 547-556, W. Junk, The Hague.
- Ikem, A. & Egiebor, N.O.** 2005. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 771-787.
- Lehr, R.E. & Jerina, D.M.** 1977. Metabolic activation of polycyclic hydrocarbons. *Archives of Toxicology*, **39**, 1-6.
- Marsden, I.D.** 1991a. Kelp-sandhopper interactions on a sand beach in New Zealand. I. Drift composition and distribution. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **152**, 61-74.
- Marsden, I.D.** 1991b. Kelp-sandhopper interactions on a sand beach in New Zealand. II. Population dynamics of *Talorchestia quoyana* (Milne-edwards). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **152**, 75-90.
- Marsden, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology-the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.
- McElroy, A.E., Farrington, J.W. & Teal, J.M.** 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In

- Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment* (Varanasi, U., ed.). pp. 1–40, CRC press, Boca Raton (FL).
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L. & Varanasi, U.** 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews. Environ. Contam. Toxicology*, **143**, 79-165.
- Palluault, M.** 1954. Notes ecologiques sur le *Talitrus saltator*. *Archives de Zoologie Experimentale et Générale*, **91**, 105-129.
- Prato, E., Pastore, M. & Pavia, B.** 1995. Il popolamento ad anfipodi del sopralitorale del Mar Piccolo di Taranto. *Thalassia Salentina*, **21**, 61-67.
- Rainbow, P.S.** 1992. The talitrid amphipod *Platorchestia platensis* as a potential biomonitor for copper and zinc in Hong Kong: laboratory and field studies. In: *The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China III. Proceedings of the Fourth International Marine Biological Workshop*. (Ed. B. Morton), pp. 599-610. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **28**, 567–582.
- Sanz-Lázaro, C., Marin, A. & Borredat, M.** 2008. Toxicity studies of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on European Amphipods. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **18**, 323-327.
- Ugolini, A., Felicioni, S., Ruffo, S. & Cipriani, N.** 1995. Distribution of *Talorchestia ugoninii* and other sandhoppers in Corsica. *Bollettino Zoologico*, **62**, 291-296.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of the heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhoppers species: *Talitrus saltator* Montagu and *Talorchestia ugoninii* Bellan Santini and Ruffo. *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaporti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349-357.
- Weeks, J.M.** 1992. The talitrid amphipod (Crustacea) *Platorchestia platensis* as a biomonitor of trace metals (Cu and Zn) in Danish waters. In: *Proceedings of the Twelfth Baltic Marine Biologists Symposium*. (Eds. E. Bjørnstad, L. Hagerman & K. Jensen), pp. 173-178. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark.
- Wildish, D.J.** 1988. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology*, **66** (11), 2340-2359.



# **CAPITOLO 9**

## **Conclusioni generali**

---



## CONCLUSIONI GENERALI

La fascia del sopralitorale, zona di notevole importanza ecologica in quanto ambiente di transizione tra l'ecosistema marino e quello terrestre, è soggetta a numerosi stress di origine antropica i quali esercitano spesso un'influenza negativa sulle comunità naturali che vi risiedono. Grazie all'utilizzo di bioindicatori è possibile quantificare gli effetti dell'attività umana e permettere una migliore gestione e tutela delle zone costiere.

I risultati di questa tesi indicano che *O. montagui* può essere utilizzata come bioindicatore della contaminazione da metalli in traccia della zona sopralitorale (cap.2 e 3), risultando un buon accumulatore di Hg, Cd, Zn e Cu. La concentrazione dei metalli accumulati da parte di questa specie durante l'arco dell'anno mostra, inoltre, una variabilità legata sia al ciclo biologico degli animali che alla concentrazione degli inquinanti presente nell'ambiente (cap.3).

Le indagini condotte su *P. oceanica* (Cap. 4) hanno confermato che questa pianta è un buon bioindicatore della contaminazione litorale da metalli in traccia, mentre la capacità di accumulare composti organici quali gli IPA appare limitata. Inoltre, la minor concentrazione di Cd, Zn, e Cu nelle foglie spiaggiate rispetto a quella registrata nelle foglie della pianta viva non sembra influire in modo significativo sulla capacità di accumulo di *O. montagui*.

Le ricerche condotte su *T. saltator* hanno evidenziato come questo anfipode possa essere impiegato come bioindicatore dei litorali sabbiosi sia per quanto riguarda gli effetti della frequentazione turistica (cap.6) sia per quelli riguardanti la contaminazione ambientale, oltre che da metalli in traccia, anche da IPA (cap. 7). Inoltre, la misurazione della variabilità genetica (mediante l'utilizzo di fISSR), come biomarker della contaminazione ambientale da metalli in traccia, ne ha evidenziato l'applicabilità in questa specie di anfipodi (cap.5).

Dallo studio sulla capacità di bioaccumulo di metalli in traccia e IPA in *T. ugolinii*, *P. platensis* e *D. deshayesii* (cap.8), sono emersi risultati promettenti per un possibile utilizzo delle tre specie di anfipodi sopralitorali come biomonitor della contaminazione da metalli in traccia, sia di coste sabbiose che di substrati rocciosi. Ulteriori ricerche si prospettano necessarie per determinare, invece, se questi anfipodi siano o meno in grado indicare il grado di contaminazione da idrocarburi aromatici del sopralitorale, tuttavia i risultati ottenuti con *P. platensis* sembrano incoraggianti.

E' opportuno sottolineare come l'utilizzo di bioindicatori quali gli anfipodi sopralitorali si possa rivelare particolarmente vantaggioso sia per la facile reperibilità e raccolta, ma anche per l'economicità dei campionamenti. E' inoltre opportuno evidenziare che la reale validazione degli anfipodi sopralitorali quali bioindicatori di effetti antropici diretti e indiretti dovrà necessariamente confrontarsi con indagini condotte a livello di popolazione e comunità. Indagini, queste, che in ecotossicologia risultano, per la loro complessità, abbastanza rare.